

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bedeutung der Syntrophin-Isoformen alpha und beta2  
für den hepatischen Lipidstoffwechsel

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Tobias Hebel

2016



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR INNERE MEDIZIN I  
PROF. DR. M. MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Bedeutung der Syntrophin-Isoformen alpha und beta2  
für den hepatischen Lipidstoffwechsel

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Tobias Hebel

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christa Büchler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Charalampos Aslanidis

Mündliche Prüfung am: 18.05.2016

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	9
1.1	Syntrophine.....	9
1.1.1	Struktur und Lokalisation der Syntrophine.....	9
1.1.2	Funktion der Syntrophine .....	10
1.2	Lipide im Organismus .....	12
1.2.1	Lipide als Bestandteil von Zellmembranen .....	13
1.2.2	Sphingomyelin .....	13
1.2.3	Cholesterin .....	14
1.2.4	SREBP2 .....	15
1.2.5	SR-BI .....	16
1.2.6	Rolle der Leber im Lipidstoffwechsel und hepatische Steatose .....	17
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
2	Material und Methoden .....	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte .....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.3	Chemikalien .....	24
2.1.4	Kit-Systeme.....	26
2.1.5	Antikörper .....	27
2.1.6	Oligonukleotid-Primer .....	28
2.1.7	siRNAs.....	29
2.1.8	Puffer und Lösungen.....	30
2.2	Methoden .....	34
2.2.1	Versuchstiere.....	34
2.2.2	Experimente in der Zellkultur .....	35
2.2.3	Bestimmung von Triglyzeriden und Lipiden .....	36
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen .....	37
2.2.5	Arbeiten mit RNA und cDNA .....	41
2.2.6	Histologische Arbeiten.....	44
2.2.7	Statistische Auswertung.....	45
3	Ergebnisse .....	46
3.1	Expression der Syntrophine alpha und beta2 in verschiedenen Zelllinien.....	46

3.2	Knockout der Syntrophine alpha und beta2 im Mausmodell .....	46
3.3	Charakterisierung des Lipidstoffwechsels der Syntrophin-defizienten Mäuse .....	47
3.3.1	Gewichtsverlauf .....	47
3.3.2	Bestimmung der Triglyzeridspiegel .....	47
3.3.3	Bestimmung der Cholesterinspiegel .....	48
3.3.4	Bestimmung der Ceramidspiegel .....	48
3.3.5	Bestimmung der Sphingomyelinspiegel .....	48
3.3.6	Histologische Untersuchung der hepatischen Lipideinlagerung .....	49
3.4	Untersuchung der am hepatischen Lipidstoffwechsel beteiligten Proteine .....	50
3.4.1	ApoA1 .....	50
3.4.2	ApoB .....	50
3.4.3	SREBP2 .....	50
3.4.4	HMG-CoA-Reduktase .....	52
3.4.5	LDL-Rezeptor .....	53
3.4.6	ABCA1 .....	53
3.4.7	SR-BI .....	53
3.4.8	Cyp7A1 .....	54
3.4.9	Caveolin-1 .....	55
3.4.10	SMS2 .....	55
3.5	Untersuchung von Leberschäden infolge der Steatose .....	56
3.5.1	CTGF .....	57
3.5.2	$\alpha$ -SMA .....	57
3.5.3	Histologische Darstellung des Fibrosierungsgrades .....	57
3.5.4	Bestimmung der Serum-Adiponektinspiegel .....	58
3.6	Replizierbarkeit der Ergebnisse in extrahepatischem Gewebe und in der Zellkultur .....	59
3.6.1	Untersuchungen am braunen Fettgewebe .....	59
3.6.2	Untersuchungen in der Zellkultur .....	60
4	Diskussion .....	62
4.1	Expression der Syntrophine .....	62
4.2	Einfluss des Knockouts auf den Lipidstoffwechsel .....	62
4.2.1	Unterschiede im Cholesterinstoffwechsel .....	63
4.2.2	Unterschiede in den Sphingomyelinspiegeln .....	65
4.3	Lipid-induzierte hepatische Schäden .....	66
4.4	Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse .....	67

5 Zusammenfassung .....	69
6 Literaturverzeichnis .....	70
7 Danksagung .....	
8 Lebenslauf .....	

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Apo	Apolipoprotein
AQP	Aquaporin
ATP	Adenosintriphosphat
au	arbitrary unit
BCA	Bicinchoninsäure(-assay)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CYP7A1	Cytochrom P450 7A1
DAPC	Dystrophin-assoziiierter Proteinkomplex
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase



HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Chlorwasserstoff, in H <sub>2</sub> O gelöst Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMG-CoA-R	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
HRP	Meerrettichperoxidase
ICA512	Islet cell auto-antigen 512
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
M	Molar (mol/L)
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	Non-alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non-alcoholic Steatohepatitis
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PDZ	PSD-95/Disc-large/Zonula-Occludens-1-Domäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunopräzipitation(-spuffer)

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription bzw. Transkriptase
S1P/S2P	Site 1 protease / Site 2 protease
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SMase	Sphingomyelinase
SMS	Sphingomyelin-Synthase
SNT	Syntrophin
SR-BI	Scavenger Receptor Class B member 1
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
SU	Syntrophin Unique-Domäne
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylenediamin
TRC8	Translocation in renal cancer from chromosome 8
UV	Ultraviolett
VLDL	Very Low Density Lipoprotein Receptor
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Syntrophine

Syntrophine sind eine Gruppe von Adaptorproteinen, deren Funktion bislang vor allem in Muskelgewebe untersucht wurde. Zur Familie der Syntrophine gehören fünf Isoformen, die Syntrophine alpha-1, beta-1, beta-2, gamma-1 und gamma-2 (im Weiteren als SNTA, SNTB1, SNTB2, SNTG1 und SNTG2 bezeichnet). Diesen Proteinen werden wesentliche Rollen unter anderem bei der intrazellulären Signaltransduktion und der Organisation von Membranproteinen sowie des Zytoskeletts zugeschrieben. Die Herleitung vom griechischen „syntrophos“, was sinngemäß etwa „Begleiter“ bedeutet, weist bereits darauf hin, dass nach derzeitigem Kenntnisstand diese Proteine nicht selbst primär ausführende Funktionen haben, sondern vielmehr dafür zuständig sind, dass andere Proteine ihre Aufgaben effektiv erfüllen können.

### 1.1.1 Struktur und Lokalisation der Syntrophine

Die Syntrophin-Isoformen SNTA, SNTB1 und SNTB2 zeigen einen einheitlichen Aufbau und enthalten verschiedene funktionelle Domänen: Von NH<sub>2</sub>-terminal her gesehen enthalten sie zwei Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH), wobei in die erste (PH1) eine PSD-95/Disc-large/Zonula-Occludens-1-Domäne (PDZ) integriert ist, sowie die sogenannte Syntrophin-Unique-Domäne (SU) [1]. Die gamma-Isoformen weichen von diesem Aufbau leicht ab [2]. Den einzelnen Domänen werden jeweils die Übernahme bestimmter Funktionen bei der Interaktion mit anderen Proteinen zugeschrieben.



**Abbildung 1:** Modularer Grundaufbau der Syntrophine aus mehreren Domänen. Nach [1].

Die einzelnen Isoformen haben eine Größe von zwischen 58 und 60 kDa; jede Isoform ist Produkt eines eigenen Gens, die entsprechenden Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen [3], [4]. Es besteht eine recht hohe Homologie zwischen den alpha- und beta-Syntrophinen der Maus und des Menschen, was Rückschlüsse vom Tierversuch auf menschliche Physiologie zumindest denkbar erscheinen lässt. Die Homologie der Syntrophine SNTA, SNTB1 und SNTB2 untereinander ist weniger hoch, was die Frage aufwirft, inwieweit sie

sich in ihrer Funktion unterscheiden und damit ob sie gegebenenfalls auch in der Lage sind einander zu ersetzen [5].

Die fünf Isoformen unterscheiden sich auch in ihrer gewebespezifischen Expression. Nach bisherigen Erkenntnissen finden sich die alpha-1-Isoform vor allem in quergestreifter Muskulatur und die beta-Isoformen ubiquitär [5]. SNTG1 scheint vornehmlich im Gehirn lokalisiert zu sein, SNTG2 zeigt wieder eine ubiquitäre Verbreitung [4]. Auch in ihrer intrazellulären Lokalisation scheint es Unterschiede zu geben [6]. Die nicht allzu stark ausgeprägte Homologie zwischen den Isoformen sowie ihre differenzielle gewebespezifische und zelluläre Lokalisation legt die Vermutung nahe, dass die Isoformen nicht völlig redundant sind, sondern jeweils eigene Aufgaben zu erfüllen haben.

### **1.1.2 Funktion der Syntrophine**

Die in der Vergangenheit wohl am gründlichsten untersuchte Interaktion der Syntrophine ist die mit dem Dystrophin-assoziierten Proteinkomplex (DAPC), dies gilt insbesondere für die alpha- und beta-Isoformen [5], [7]. Dass dieser Verbindung besondere Aufmerksamkeit gewidmet wurde liegt daran, dass Mutationen im Dystrophin-Gen bekannt sind, die zu schweren degenerativen Myopathien führen, vor allem der X-chromosomal vererbten Muskeldystrophie vom Typ Duchenne oder der milderen Form vom Typ Becker [8]. Der DAPC, zu dem neben Dystrophin noch eine ganze Reihe weiterer Proteine gehören, durchspannt die Plasmamembran der Zelle und verbindet letztlich das innere Zytoskelett mit der extrazellulär liegenden Basallamina [8]. Manche Daten lassen auch vermuten, dass Syntrophin direkt mit Actin interagieren kann [9]. In Zusammenschau legen diese Ergebnisse nahe, dass den Syntrophinen eine Rolle bei Aufbau und Stabilisierung des Zytoskeletts zukommt. Eine weitere Funktion, die in der bisherigen Forschung immer wieder den Syntrophinen zugeschrieben werden konnte, ist die Assoziation mit Transmembranproteinen. Zu den bisher identifizierten Interaktionspartnern gehören unter anderem Natrium- [10] und Kaliumkanäle [11], unselektive Kationenkanäle [12], Wasserkanäle [13] und adrenerge Rezeptoren [14]. Am Beispiel des Wasserkanals Aquaporin-4 (AQP4) soll kurz dargestellt werden, wie der Einfluss der Syntrophine auf ihre Interaktionspartner aussehen kann. In einem Knockout-Tiermodell, dem SNTA fehlte, konnte man nachweisen, dass dieses Syntrophin in verschiedenen Geweben zum einen die Genexpression des AQP4 modulieren kann, zum anderen jedoch auch nur die zelluläre Lokalisation des Wasserkanals beeinflussen kann [13]. Hierbei nimmt das Syntrophin also anscheinend keinen Einfluss auf Genexpression und Gesamtmenge seines

Zielproteins, sondern vermittelt seine Funktion, indem es den Kanal an seinen Bestimmungsort dirigiert.

Weitere Funktionen scheinen die Syntrophine in der Signaltransduktion zu besitzen. So konnte eine Assoziation mit G-Protein-Untereinheiten nachgewiesen werden [15], [16]. G-Proteine spielen eine zentrale Rolle für die Weiterleitung von Signalen, die von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren empfangen werden. Zu dieser Proteinfamilie zählt eine ganze Reihe wichtiger Rezeptoren im menschlichen Körper. Aufgrund der überragenden Bedeutung dieses Signalpfades wurde 2012 der Nobelpreis für Chemie für die Charakterisierung dieses Systems vergeben [17].

Immer wieder finden sich auch Hinweise für die Beteiligung der Syntrophine an sogenannten „second-messenger“-Systemen. Als second messenger bezeichnet man Moleküle, die das – meist von extrazellulär kommende – Signal des first messenger (zum Beispiel ein Hormon) im Inneren der Zelle weiterleiten und dabei verstärken. Für drei wichtige second messenger-Systeme konnte bereits eine Assoziation mit Syntrophinen nachgewiesen werden: die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) [18], die den second messenger Stickstoffmonoxid bereitstellt, das Protein Calmodulin [19], das den second messenger Calcium bindet sowie das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) [20], aus dessen Hydrolyse der second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) hervorgeht. Wenn auch die umfassende Charakterisierung dieser Signalfade und die Rolle der Syntrophine dabei noch Jahre in Anspruch nehmen werden, ist es doch auffällig, wie häufig diese Assoziationen bereits gefunden wurden.

Direkte Assoziationen von Syntrophinen mit Regulatorproteinen des Stoffwechsels waren lange Zeit nicht bekannt. Erste Hinweise in diese Richtung ergaben sich, als man eine Rolle für SNTB2 in pankreatischen beta-Inselzellen fand, die für die Insulinausschüttung zuständig sind. In diesen Zellen fand man eine Assoziation des SNTB2 mit dem Protein Islet cell autoantigen 512 (ICA512) [21]. ICA512 ist ein Protein, das mit den Membranen der Granula assoziiert ist, in denen das Insulin bis zu seiner Freisetzung gespeichert wird. Bei Stimulation der beta-Inselzelle und folgender Insulinsekretion wird ICA512 durch die Protease Calpain gespalten und wandert in den Zellkern, wo es die Insulinexpression anregt [22]. Desweiteren stimuliert es die Insulinsekretion [23] und die Proliferation der Inselzellen [24]. SNTB2 hat hier vermutlich die Aufgabe, die Motilität der insulinhaltigen Granula zu reduzieren, indem es sie an das Aktin-Zytoskelett verankert, was ihre Beweglichkeit hin zur Plasmamembran behindert. Diese Interaktion kann durch Phosphorylierung von SNTB2 moduliert werden [25]. Aufgrund der hohen Prävalenz und volkswirtschaftlichen Bedeutung von Diabetes mellitus,

einer Erkrankung durch Dysfunktion von oder unter Beteiligung des endogenen Pankreas, ist die mögliche Beteiligung von SNTB2 an der Insulinsekretion und Inselzellproliferation von hohem Interesse.

Eine weitere wichtige Entdeckung im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel war die Assoziation von Syntrophinen mit dem Membranprotein ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1), auch als Cholesterol Efflux Regulatory Protein (CERP) bekannt, die für SNTA, SNTB1 und SNTB2 nachgewiesen werden konnte [26], [27], [28]. Für SNTB1 konnte zudem in der Zellkultur nachgewiesen werden, dass es die effektive Proteinmenge an ABCA1 erhöht, vermutlich indem es dieses vor proteolytischem Abbau schützt. Dabei handelt es sich um einen rein post-transkriptionellen Mechanismus, da die mRNA-Menge an ABCA1 durch SNTB1 nicht signifikant beeinflusst wurde [27]. ABCA1 ist ein membrandurchspannendes Protein, das den Export von Cholesterin und Phospholipiden aus der Zelle in den Blutstrom vermittelt, wo sie an der Bildung von High Density Lipoprotein-Partikeln (HDL) beteiligt sind [29]. Bestimmte Mutationen im ABCA1-Gen führen zur Tangier-Krankheit, die mit erniedrigten HDL-Spiegeln und Cholesterinablagerungen in verschiedenen Geweben einhergeht [30]. Auch abgesehen von dieser seltenen monogenetischen Erkrankung hat sich ein höherer HDL-Blutwert (oft fälschlicherweise als gutes „Cholesterin“ bezeichnet) in den vergangenen Jahrzehnten durch zahlreiche epidemiologische Studien den Ruf eines protektiven Faktors gegen kardiovaskuläre Erkrankungen erworben [31], der führenden Todesursache in den Industriestaaten. Diese Assoziation mit ABCA1 führte dazu, dass unsere Arbeitsgruppe sich näher mit einem möglichen Einfluss der Syntrophine auf den Lipidstoffwechsel beschäftigte.

## **1.2 Lipide im Organismus**

Lipide sind im weitesten Sinne Biomoleküle, die einen stark hydrophoben Charakter haben, sich in lipophilen Lösungsmitteln jedoch gut lösen. Sie kommen im Organismus in vielen verschiedenen Formen vor, zu den wichtigsten zählen dabei die Fettsäuren, die Triglyceride (die eigentlichen „Fette“), die Glycerophospho- sowie die Sphingolipide und das Cholesterin. Ermöglicht durch die Vielfalt ihrer Struktur erfüllen Lipide auch eine Vielzahl von Aufgaben: Sie stellen unter anderem den größten Speicher verwertbarer Energie dar [32], sie isolieren den Körper gegen Kälte [32], haben essentielle Rollen bei der Signaltransduktion [33], [34], sind Vorstufe wichtiger Hormone [35] und sind Hauptbestandteil der Zellmembranen [35-36].

### **1.2.1 Lipide als Bestandteil von Zellmembranen**

Da wie zuvor aufgeführt einige der interessantesten bekannten Funktionen der Syntrophine ihre Assoziation mit Transmembran- und membranassoziierten Proteinen betrifft, soll im Folgenden kurz die derzeitige Vorstellung von der Plasmamembran der Zelle beschrieben werden.

Viele Lipide sind amphiphiler Natur, das heißt sie besitzen sowohl ein hydrophiles als auch ein hydrophobes Ende. In wässriger Lösung nehmen sie spontan die für sie energetisch günstigste räumliche Konformation an, indem sie die hydrophilen Enden zum Wasser und die hydrophoben Enden zueinander ausrichten; das Ergebnis sind Mizellen oder Lipiddoppelschichten, für die auch die Zellmembran ein Beispiel ist [37]. In tierischen Membranen auffindbare Lipidspezies sind Glycerophospholipide, Sphingolipide und Sterole. Während die ersten beiden Gruppen in eine Vielzahl von Subspezies unterteilbar sind, handelt es sich bei dem Sterol in menschlichen Zellen überwiegend um Cholesterin [37].

In einer älteren Vorstellung dachte man sich die Plasmamembran als eine ausgedehnte zweidimensionale Fettschicht, in der die Membranproteine gelöst waren und frei „schwimmen“ konnten, das sogenannte Fluid-Mosaik-Modell [36]. Zunehmend setzte sich jedoch die Ansicht durch, dass es sich bei der Membran nicht um eine einheitliche, überall gleich beschaffene Schicht handelt, sondern dass es eine ausgeprägte laterale Organisation in verschiedene Bereiche gibt [38]. Besonders hervorzuheben sind hierbei die sogenannten lipid rafts, bestimmte sphingolipid- und cholesterinreiche Areale, die in der Lage sind, verschiedene membranassoziierte Proteine auf beiden Seiten der Lipiddoppelschicht räumlich zusammenzuführen. Dies könnte besondere Implikationen für die Signaltransduktion haben, da hier die räumliche Nähe aller an der Kaskade beteiligten Proteine die Prozessgeschwindigkeit erhöhen und unerwünschten „crosstalk“ mit anderen Signalfaden vermindern kann [38]. So spricht man mittlerweile sogar schon von ganzen „Signalosom“-Komplexen anstelle einzelner Proteine, etwa bei einem Subtyp der adrenergen Rezeptoren [39], an dessen Bildung auch wieder Syntrophine beteiligt sind [14], [40].

### **1.2.2 Sphingomyelin**

Sphingomyelin gehört zur Klasse der Sphingolipide, deren einfachster Vertreter das Ceramid ist. Bei Ceramid handelt es sich um den Aminoalkohol Sphingosin, der an der Aminogruppe acyliert wurde. Wird zusätzlich noch die Hydroxygruppe des Sphingosins mit Phosphocholin substituiert, erhält man das Sphingomyelin [34]. Zelluläres Sphingomyelin findet sich mit

Vorliebe in der Plasmamembran [41] und ist in dieser räumlich nicht gleich verteilt, was mit der oben dargestellten Vorstellung der lipid rafts vereinbar ist [42]. Auffällig ist hierbei die immer wieder gefundene Assoziation von Sphingomyelin und Cholesterin und ihr Zusammenwirken bei der Organisation dieser Mikrodomänen [43]. Sphingomyelin findet sich in Lipoproteinen und in atherosklerotischen Läsionen [44], und erhöhte Serumspiegel scheinen ein eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen zu sein [45], [46]. Durch Hydrolyse von Sphingomyelin entsteht das Ceramid, das eine Rolle in einer Vielzahl von Signal- und Stoffwechselfaden, insbesondere bei der Apoptose spielt; angeborene Defekte im Abbau von Sphingomyelin führen zu seiner Anreicherung in verschiedenen Organen, der Niemann-Pick-Krankheit [47].

### **1.2.3 Cholesterin**

Cholesterin ist ein Derivat des polyzyklischen Alkohols Sterol. Es ist in den Zellen des Körpers allgegenwärtig und findet sich bevorzugt in der Plasmamembran [41], wo es unter anderem deren Fluidität und Barrierefunktion modulieren soll [48]. Hervorgehoben sei noch einmal die schon angedeutete Bedeutung des Cholesterins für die Organisation der lipid rafts, insbesondere auch in Zusammenarbeit mit Sphingomyelin.

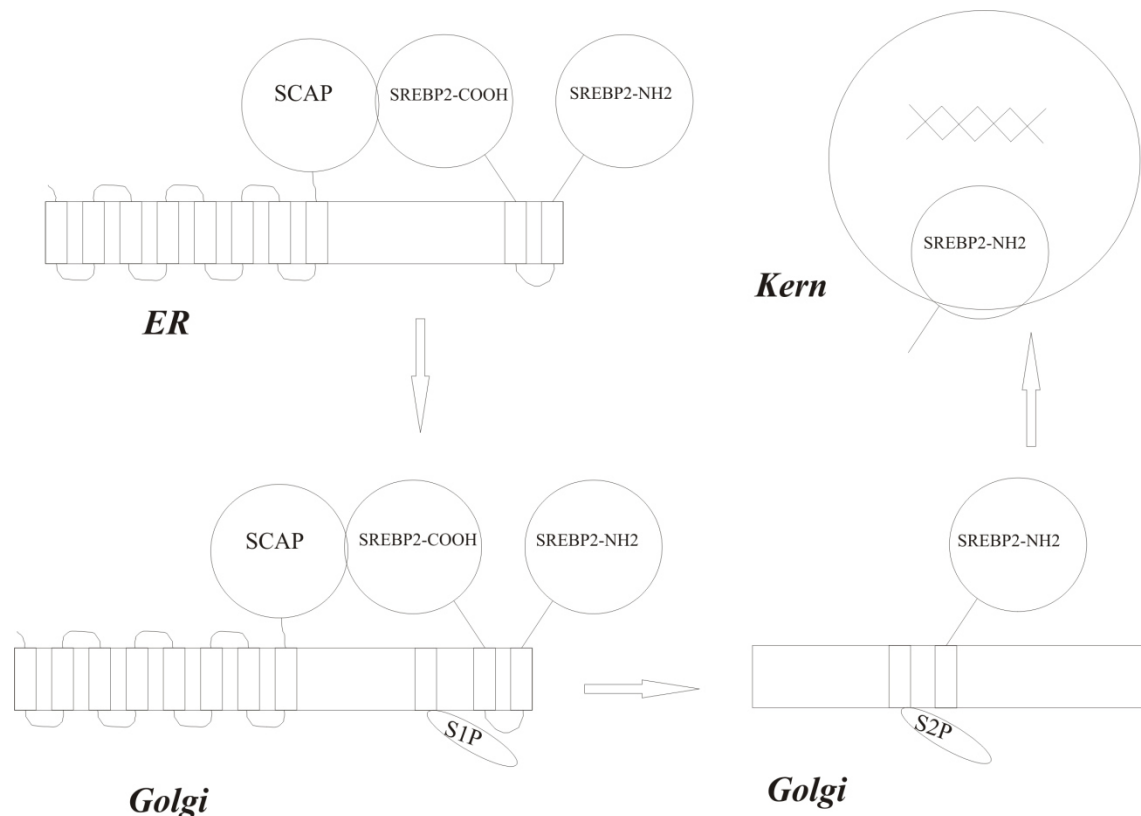
Cholesterin hat über die letzten Jahrzehnte besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit erfahren, da dieses Molekül wie kaum ein anderes in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gebracht wird. Zu den bedeutendsten zählen hierbei die koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre Ereignisse und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Die Assoziation mit diesen schwerwiegenden und in den wirtschaftlich privilegierten Ländern volkswirtschaftlich höchst bedeutenden Erkrankungen hat dazu geführt, dass Hemmer der endogenen Cholesterinsynthese, die Statine, mittlerweile zu den verbreitetsten Medikamenten überhaupt gehören; die Kosten für diese gehen dabei in den dreistelligen Millionenbereich [49]. Die Gefährlichkeit des Cholesterins liegt bereits in seiner chemischen Struktur begründet; seine schlechte Löslichkeit in wässrigem Milieu führt dazu, dass es kaum noch entfernt werden kann wenn es sich erst einmal abgelagert hat, etwa in atherosklerotischen Plaques [35]. Aufgrund der tödlichen Gefahr bei Ablagerung des Cholesterins ist die Regulation seiner Konzentration im Körper aufwändig und wird von einer Vielzahl von Proteinen sichergestellt, die die Aufnahme von Nahrungscholesterin, die Eigensynthese sowie die Ausscheidung dieses Moleküls steuern [50]. Aufgrund der stark hydrophoben Eigenschaften findet der Transport im Blut an Lipoproteine gekoppelt statt. Cholesterin ist jedoch nicht nur ein potenziell gefährlicher Stoff,



sondern vor allem ein essentielles Molekül für den Organismus. Neben dem erwähnten Einfluss auf die Fluidität von Membranen dient es als Ausgangsstoff für Gallensäuren, Steroidhormone und Vitamin D, denen allesamt lebenswichtige Aufgaben im Körper zukommen [50].

#### **1.2.4 SREBP2**

Um einen konstanten Cholesteringehalt aufrecht erhalten zu können, muss die Zelle zunächst einmal registrieren können, wie hoch die derzeitige Menge ist. Diese Funktion nehmen die Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBPs) wahr, von denen gegenwärtig drei Isoformen bekannt sind: SREBP-1a, SREBP-1c und SREBP2. Die ersten beiden entstehen durch alternative Transkription aus demselben Gen, während SREBP2 Produkt eines eigenständigen Gens ist [51]. Diese Proteine können den Lipidgehalt der Zelle wahrnehmen und kompensatorisch darauf reagieren. Während SREBP-1c eher für die Fettsäurehomöostase zuständig ist, dient SREBP2 der Kontrolle der Cholesterinspiegel; die Rolle von SREBP-1a ist weniger spezifisch definiert [52]. Am Beispiel von SREBP2 soll die Funktion dieser Proteine kurz dargestellt werden: Bei zunehmender Cholesterindepletion ändert sich die Konformation von SREBP cleavage activating protein (SCAP), welches wie SREBP2 in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Die neue Konformation bewirkt, dass SCAP das SREBP2 zum Golgi-Apparat „eskortiert“. In dessen Membran wiederum befinden sich Site-1 protease (S1P) und Site-2 protease (S2P). Diese beiden Proteasen spalten SREBP2 an zwei verschiedenen Stellen; im ersten Schritt wird das immer noch membranständige SREBP2 gespalten, im zweiten Schritt wird das aminoterminal Ende abgetrennt und aus der Membran „befreit“, woraufhin es in den Zellkern wandert. Dort aktiviert es die Transkription mehrerer Gene, deren Aktivität den Cholesteringehalt der Zelle wieder erhöht. Dazu gehören etwa die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), das Schrittmacherenzym der Cholesterinbiosynthese oder der Low Density Lipoprotein-Rezeptor (LDL-R), mit dessen Hilfe die Zelle cholesterinreiche Partikel aus dem Blutstrom aufnehmen kann [53], [51], [52].



**Abbildung 2:** SCAP eskortiert SREBP2 von der Membran des ER zu der des Golgi-Apparates, wo in zwei Schritten durch die Proteasen S1P und S2P das aminoternale Ende abgespalten wird, welches in den Kern wandert und die Transkription mehrerer Zielgene beeinflusst. Vereinfacht nach [53].

### 1.2.5 SR-BI

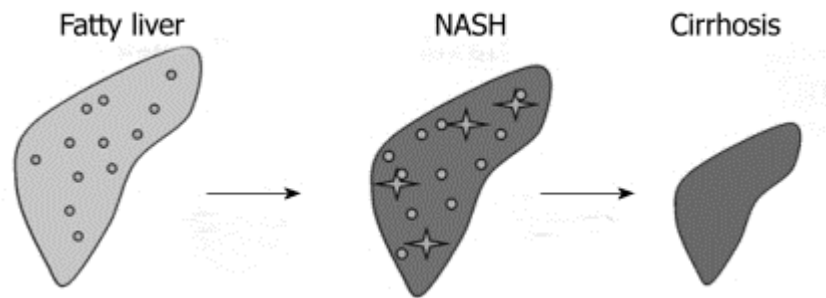
Scavenger receptor class B member 1 (SR-BI), ein Membranprotein, fungiert als HDL-Rezeptor der Zelle. Hierbei scheint SR-BI die Aufnahme von Cholesterinestern aus den HDL-Partikeln zu fördern, ohne aber die Partikel selbst zu endozytieren, weshalb dieser Vorgang auch als „selektive“ Aufnahme von Cholesterinestern bezeichnet wird [54]. Eine sehr hohe Expression dieses Proteins wurde in der Nebenniere und den Ovarien beschrieben [54], also Geweben, die zur Synthese von Steroidhormonen auf eine zuverlässige Cholesterinzufuhr angewiesen sind. Dazu passend lässt sich die Menge an SR-BI in verschiedenen Geweben durch Sexualhormone modulieren [55]. Eine kräftige Expression findet sich auch in der Leber [54], hier wird dem Rezeptor eine wichtige Rolle beim reversen Cholesterintransport zugeschrieben. Hierunter versteht man den Weg des Cholesterins weg von „peripheren“ Zellen des Körpers hin zur Leber, die als einziges Organ in der Lage ist, das Cholesterin durch Umwandlung in Gallensäuren über den Darm endgültig aus dem Körper zu eliminieren [56].

### **1.2.6 Rolle der Leber im Lipidstoffwechsel und hepatische Steatose**

Die Regulierung des Lipidhaushaltes ist eine wichtige Aufgabe für jede einzelne Zelle. Allerdings kommt der Leber hierbei eine besondere Rolle als zentrales Stoffwechselorgan im Körper zu, dies sei am Beispiel des Cholesterinmetabolismus beschrieben.

Die Leber ist Syntheseort der meisten Plasmaproteine, so auch fast aller Apolipoproteine, und ein wichtiger Ort der Cholesterinsynthese; rund 80% des Serumcholesterins stammen aus der Eigensynthese des Körpers, nur ein kleiner Teil aus der Nahrung [57], [50]. Über den Darm aufgenommene Lipide werden in Chylomikronen verpackt und über Lymph- und Blutbahn der Leber zugeführt [58], [50]. Von der Leber aus wird mit der Nahrung aufgenommenes oder neu gebildetes Cholesterin mittels Very Low Density Lipoproteinen (VLDL) in die Peripherie des Körpers exportiert; die dabei entstehenden Low Density Lipoproteine (LDL) werden über den LDL-Rezeptor wieder von der Leber endozytiert [58], [50]. Im Zuge des oben bereits beschriebenen „reversen“ Cholesterintransports nimmt die Leber das Cholesterin aus HDL-Partikeln via SR-BI wieder auf. Schließlich ist dieses Organ wie bereits angedeutet in der Lage, Cholesterin zu Gallensäuren zu oxidieren. Diese werden über die Gallenwege in das Duodenum abgegeben, wo sie lipidreiche Nahrungsbestandteile emulgieren. Ein großer Teil der Gallensäuren wird im terminalen Ileum rückresorbiert und über den enterohepatischen Kreislauf der Leber wieder zur Verfügung gestellt, ein gewisser Teil jedoch verlässt den Organismus über den Stuhl endgültig und entfernt somit das Cholesterin aus dem Kreislauf [59],[50]. Durch ihre Sonderstellung im Pfortaderkreislauf kommt die Leber mit fast allen über die Nahrung aufgenommenen Substanzen in Berührung, bevor diese an anderen Stellen aufgenommen oder metabolisch umgewandelt werden können. Dies bringt auch mit sich, dass die Leber jeden potenziell toxischen Stoff aufnehmen und daran kurz- oder langfristig Schaden nehmen kann. Dass bestimmte Substanzen, wie etwa Ethanol, hepatotoxisch wirken können, ist seit langem bekannt. In den letzten Jahren hat sich jedoch die Erkenntnis durchgesetzt, dass auch eine Fehlernährung die Leber schwer schädigen kann. Die dabei entstehenden Schäden am Organ ähneln ethanolinduzierten Schäden und können zu Hepatitis und Fibrose führen [60]. Die genaue Pathogenese ist hierbei noch nicht aufgeklärt, jedoch scheint erwiesen, dass die Steatose, also die Lipideinlagerung in Hepatozyten hierbei eine Schlüsselrolle spielt und ein gestörter hepatischer Lipidstoffwechsel ursächlich sein könnte [61]. Daher wird die Erkrankung als Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) bezeichnet, die zur Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) führen kann. Auf dem Boden der NASH kann dann eine Fibrose entstehen, die ihrerseits bis zur Leberzirrhose und sogar zum hepatozellulären Karzinom (HCC)

führen kann, wobei die Schwere und die Geschwindigkeit dieses Verlaufs interindividuell sehr unterschiedlich sein können [62], [63].



**Abbildung 3:** Mögliche Progression der NAFLD zur NASH und von dort ausgehend zur Zirrhose. Abgewandelt mit Genehmigung aus [127].

Die NAFLD zeigt Assoziation mit anderen „Wohlstandsproblemen“ wie etwa hohem Body Mass Index (BMI), hohem Taillenumfang, oder hohen Triglyzerid- und niedrigen HDL-Serumspiegeln [64]. Die Prävalenz der Erkrankung ist stark abhängig von der Auswahl der Studienpopulation und der verwendeten Diagnostik, ist aber in jedem Falle in den Industrieländern mit etwa 20-30% sehr hoch [64], [65]. Betrachtet man Subgruppen ohnehin stark adipöser Patienten, so ist das Vorkommen von NAFLD und NASH noch viel höher [66]. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist von Interesse, ob und wenn ja welche Lipide ursächlich für die Entwicklung der Erkrankung sind. Starke Hinweise deuten dabei auf mit der Nahrung aufgenommenes Cholesterin, welches in der Leber akkumuliert und toxisch wirkt [67]. Diese These wird unterstützt durch die Tatsache, dass medikamentöse Senkung von Cholesterin einen günstigen Einfluss auf die Symptome und Folgen von NAFLD/NASH hat [68]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass freie Fettsäuren (FFA), Sphingolipide, hierbei insbesondere der Sphingomyelin-Metabolit Ceramid, lipotoxisch wirken und die Entstehung und Progression der NAFLD vorantreiben können [69], [70].

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Mehrere Publikationen sowie unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass Syntrophine Funktionen im Lipidstoffwechsel übernehmen. Unter diesem Aspekt wurde diese Gruppe von Proteinen unseres Wissens nach bisher noch so gut wie nicht charakterisiert. Hierzu sollen Untersuchungen in SNTA <sup>-/-</sup>, SNTB2 <sup>-/-</sup> Doppel-Knockout-Mäusen

angestellt werden, die gegebenenfalls um Experimente in der Zellkultur erweitert werden können. Angesichts der beschriebenen Schlüsselrolle der Leber im Lipidstoffwechsel sollen sich die Untersuchungen auf dieses Organ konzentrieren. Es sollen, stets im Vergleich mit einer Kontrollgruppe aus Wildtyp-Tieren, verschiedene Lipidspezies quantitativ erfasst werden sowie die Protein- und mRNA-Mengen verschiedener am Lipidstoffwechsel beteiligter Proteine bestimmt werden. Durch Vergleich der Protein- mit der mRNA-Menge können Hinweise darauf gewonnen werden, ob mögliche Regulationsvorgänge prä- oder posttranskriptionell ablaufen. Da wie geschildert ein gestörter Lipidstoffwechsel zur Entwicklung von Lebererkrankungen führen kann, sollen die Organe der Tiere auch auf die mögliche Entwicklung struktureller Schäden hin untersucht werden; dies kann durch Analyse pathogenetisch bedeutsamer Proteine oder histologische Färbemethoden geschehen. Da in unserer Gruppe bereits SNTA und SNTB2 einzeln untersucht wurden, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem Einfluss eines kombinierten Fehlens der beiden Isoformen. Hieraus sollen in Zusammenschau Erkenntnisse gewonnen werden, inwieweit die Isoformen ähnliche Funktionen übernehmen, und ob ihr gemeinsames Fehlen die Folgen des Einzel-Knockouts bzw. Knockdowns aufhebt, potenziert oder gänzlich neue Effekte produziert.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegelkammer (12x4cm und 7x15cm)	Bio-Rad
Analysenwaage BP 221 S	Sartorius
Analysenwaage PT-1200	Sartorius
Autoklav Varioklav Dampfsterilisator	H+P
Automixer II Plus	Kodak
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik
CCD-Kamera	Rainbow
ChemiDoc™ XRS+ Molecular Imager® inkl. ImageLab™-Software	Bio-Rad
Drehschieber Vakuumpumpe RZ 2	Vacubrand
ELISA-Reader	Molecular Devices
Entwickler M35 X-Omat Prozessor	Kodak
Flüssigstickstoffanlage ESPACE 600	Air Liquide Karyotechnik
Färbegestell Hecht	Omnilab
Färbekasten nach Hellendahl	Roth
Glaskasten mit Zubehör nach Hauser	Roth
Glaskasten Hecht	Omnilab
Inkubationsschrank S150	Stuart

LightCycler® Karussell Zentrifuge	Roche
LightCycler® Real-Time-RT-PCR und Zubehör	Roche
Magnetrührer MR 3000 D	Heidolph
Magnetrührer mit Heizplatte MR 3001 K	Heidolph
Mikrotom RM 2145	Leica
Mikroskop DM IL und Zubehör	Leica
Mikroskop Axiovert 200 M und Zubehör	Zeiss
Mikrowellengerät 7015	Privileg
Milli-Q Biocel	Millipore
Peristaltikpumpe Pumpdrive 5001	Heidolph
pH-Meter 764 Multi-Calimatic	Knick
Photometer Scandrop 250 und Zubehör	Analytik Jena
Photometer Varioscan Flash Multimode Reader	Thermo Scientific
Pipettensatz	Eppendorf
Power Supply E835	Consort
Power Supply Power Pac 200	Bio-Rad
Pumpe MC 1000 PEC	Multifix
Schüttler 3013	GFL
SDS-Gelapparatur Minigel und Zubehör	Bio-Rad
Sequenza Slide Rack	Thermo Scientific
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments
Sterilisator WTC	Binder
Thermoblock TB 1	Biometra

Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf
Trans-Blot Cell Wettransferkammer	Bio-Rad
Ultraschallgerät mit Power Supply	Bandelin
UV-Flächenstrahler TFX-20 M	MWG-Biotech
UV/Vis Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia
Vakuumpumpe	KNF Laboport
Vortex VF2	Janke und Kunkel
Wasserbad HI 1210	Leica
Wasserbad WPE 45	Memmert
X-Ray Filmkassette (18x24cm)	Siemens
Zellzählkammer, Tiefe 0,1mm	Neubauer
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments

### **2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpipette 5ml	BD Falcon
Biosphere Filterspitzen 10µL, 1250µL	Sarstedt
Combitips plus	Eppendorf
Dampfsterilisator-Indikatorband	Omnilab
Deckgläser	VWR
Einmal-Feindosierungsspritze	Braun Injekt®



ELISA 96-Lochplatte	Corning®Costar®
Filterspitzen	Biozym
GentleMACS™ Tubes	Miltenyi
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences
iMark™ Microplate Reader	Bio-Rad
Immun-Blot® PVDF-Membran 0,2µm	Bio-Rad
Konische Röhrchen 15mL, 50mL	BD Falcon
LightCycler© Kapillaren 20µL	Roche
Microtube EDTA	Sarstedt
Objektträger Superfrost Ultra Plus	VWR
Parafilm	American National Can™
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1.5ml, 2.0ml	Eppendorf
Schraubröhrchen 15ml, 50ml	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten 5mL, 10mL	Sarstedt
Serologische Einwegpipetten 25mL, 50mL	Corning® Costar®
Sterile Filterspitzen 10µL, 1250µL	Sarstedt
Sterile Filterspitzen 100µL, 200µL	Biozym Diagnostik
Sterile Kanülen	BD Microlance™
Sterilfilter	Millipore
Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose 0,2µm	Bio-Rad
Trockenblock für Objektträger	Labomedic

Vakuum-Sterilfiltrationssystem 50ml, 150ml, 500ml	Millipore
Wiegeschälchen	Omnilab
Whatmanpapier GB003 0,8mm	VWR
Zellschaber	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Sarstedt
Zellkulturplatten 6-Loch, 12-Loch	BD Falcon

### 2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelagert.

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
2-Mercaptoethanol	Sigma
2-Propanol	Merck
Acrylamidlösung 40%	Bio-Rad
Ammoniumpersulfat	APS
Biosafe™ Coomassie-Färbelösung	Bio-Rad
Bisacrylamidlösung 2%	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA Fraktion V	Biomol
BSA Fraktion V für ELISA	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholat	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DMEM, Hochglukose	Biochrom AG

Entellan	Merck
Eosin-G-Lösung	Roth
Essigsäure 99%ig	Merck
Ethanol	Merck
Fast Green FCF	Sigma
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG
Formaldehydlösung 37%	Merck
Glyzin	Merck
Hämalaunlösung	Roth
Histol	Roth
IGEPAL	Sigma
Kalziumchlorid	Merck
Magermilchpulver	Vitalia
Methanol, technischer	Chemikalienausgabe
N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Natriumazid	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nukleasefreies Wasser	Promega
PBS Dulbecco	Biochrom AG

Penicillin/Streptomycin	Gibco
PeqGOLD Protein Marker	Peqlab
PhoSTOP Phosphataseinhibitor Cocktail	Roche
Picrinsäure	Merck
Salzsäure rauchend	Merck
Schwefelsäure rauchend	Merck
Sirius Red	Merck
Tert-Butanol	Merck
Tris-HCl	Merck
Tris-NH <sub>3</sub>	Merck
Trizol-Reagenz	Invitrogen
Trypsin/EDTA	Gibco
Tween®20	Sigma
Xylol	Merck

#### **2.1.4 Kit-Systeme**

Die folgenden Kits wurden mit den enthaltenen Reagenzien bereits gebrauchsfertig versandt.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Cholesterin Einzeltest	Diaglobal
DuoSet® ELISA Development Systems mouse Adiponektin	R&D Systems
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	Amersham Biosciences

Endo-Porter	GeneTools
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche
Reverse Transcription System	Promega
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Triglyceride GPO-PAP, Halbmikro-Test	Roche
XtremeGene siRNA Transfection Reagent	Roche

## 2.1.5 Antikörper

Alle Antikörper wurden nach Herstellerangaben gelagert.

### 2.1.5.1 Primäre Antikörper

Die Spezies bezeichnet den Organismus, aus dem der Antikörper isoliert wurde.

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
anti- $\alpha$ -SMA	Maus	Abcam
anti-ABCA1	Maus	Abcam
anti- $\beta$ -Actin	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
anti-ApoAI	Ziege	Biodesign
anti-Caveolin-1	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
anti-CTGF	Maus	Abnova
anti-GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling Technologies
anti-HMG-CoA-Reduktase	Kaninchen	Millipore
anti-SMS2	Kaninchen	Thermo Scientific Pierce
anti SNTA	Kaninchen	Prof. Adams in Kooperation
anti-SNTB2	Kaninchen	Prof. Adams in Kooperation
anti-SR-BI	Kaninchen	US Biological
anti-SREBP2	Kaninchen	Cayman

### 2.1.5.2 Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen-HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research
anti-Maus-HRP-konjugierter AK	Ziege	Jackson Immuno Research
anti-Ziege-HRP-konjugierter AK	Esel	Jackson Immuno Research

### 2.1.6 Oligonukleotid-Primer

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit als Primer für die PCR verwendeten Oligonukleotide aufgelistet sowie die Größe des entsprechenden Amplifikats in Basenpaaren (bp). Alle hier aufgelisteten Primer wurden von der Firma Metabion hergestellt. Zusätzlich wurde das mit Hilfe der jeweiligen Primer erfolgreich amplifizierte PCR-Produkt von der Firma GeneArt sequenziert, um die Identität zu bestätigen.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Amplifikat
ABCA1_m_uni	GAT GAA CCA ACC ACA GGC AT	355 bp
ABCA1_m_rev	GAG ATG ACA AGG AGG ATG GAA	
ApoA1_m_uni	CTT GGG CCA ACA GCT GAA	144 bp
ApoA1_m_rev	TCC TGT CTC ACC CAA TCT GTT	
ApoB_m_uni	TGA ATG TCT ACT TCC ACC CAC A	144 bp
ApoB_m_rev	GGG AGC CTA GCA ATC TGG A	
Cyclophilin_m_uni	AAC ACA AAC GGT TCC CAG TT	326 bp
Cyclophilin_m_rev	TTG AAG GGG AAT GAG GAA AA	
Cyp7A1_m_uni	CAC ATA AAG CCC GGG AAA G	242 bp
Cyp7A1_m_rev	GGC TGC TTT CAT TGC TTC A	
GAPDH_m_uni	TGT CCG TCG TGG ATC TGA C	375 bp
GAPDH_m_rev	AGG GAG ATG CTC AGT GTT GG	
HMG-CoA-R_m_uni	TGT GCT TGG GGC TTC TGT A	225 bp
HMG-CoA-R_m_rev	CCA CGT TCA TGA GTT TCC ATT	

LDL-R_m_uni	GAT GGC TAT ACC TAC CCC TCA A	274 bp
LDL-R_m_rev	CCT TTT CTG TCC CCA GAC AA	
SR-BI_m_uni	TGC CCC AGG TTC TTC ACT AC	113 bp
SR-BI_m_rev	CCA AAA CAA AAA GCA TTT CTC C	
SREBP2_m_uni	CCC TAT TCC ATT GAC TCT GAG C	71 bp
SREBP2_m_rev	GAG TCC GGT TCA TCC TTG AC	

### 2.1.7 siRNAs

Die verwendeten, im Folgenden aufgelisteten Silencer® Select Pre-Designed siRNAs für den Gen-Knockdown wurden von der Firma Ambion hergestellt, ebenso die dazugehörige Negativkontrolle (Silencer® Select Negative Control #1). Für jedes der beiden Gene, SNTA und SNTB2, sind verschiedene siRNAs aufgelistet. Diese wurden nicht allein, sondern stets als Pool der Einzel-siRNAs eingesetzt, im Folgenden steht daher etwa SNTA–siRNA stets für eine Mischung aus den siRNAs 714113-74115, entsprechend für SNTB2 aus 74119-74121. Dabei wurden die Einzel-siRNAs jeweils im Verhältnis 1:1:1 gemischt.

ID-Nummer	siRNA	Sequenz (5' → 3')
s74113	SNTA sense	CAA GAU GCC UAU UCU CAUUt
	SNTA antisense	AAU GAG AAU AGG CAU CUUGt
s74114	SNTA sense	CGA UGG UCU UUA UCA UCCAt
	SNTA antisense	UGG AUG AUA AAG ACC AUCGt
s74115	SNTA sense	UGA AGG AGG UCU CAC CCUA
	SNTA antisense	UAG GGU GAG ACC UCC UUCAg
s74119	SNTB2 sense	ACC UUG AUC UUA CGC UGCAt
	SNTB2 antisense	UGCAGCGUAAGAUC AAGGgt
s74120	SNTB2 sense	GAAGAUGUCUGCUGAUGAUt
	SNTB2 antisense	AUCAUCAGCAGACAUCUUCag
s74121	SNTB2 sense	GCAAGGAAGUCAAGCAUAU
	SNTB2 antisense	AUAUGCUUGACUCCUUGctg

### **2.1.8 Puffer und Lösungen**

Die folgenden, aus den Grundbestandteilen im Labor selbst hergestellten Lösungen wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt, sofern nicht anders angegeben.

#### ***2.1.8.1 Lösungen für die Proteinextraktion***

##### **RIPA-Lysepuffer für GentleMACS**

NaCl, 3M Stammlösung	2,5mL
Desoxycholat	0,25g
Tris, 1M Stammlösung pH 7,5	2,5ml
	ad 50ml ddH <sub>2</sub> O

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert. Bei Verwendung zur Homogenisierung der Leberlysate im GentleMACS wurden, wie weiter unten beschrieben, noch Protease- und Phosphataseinhibitor sowie Igepal und SDS hinzugegeben.

#### ***2.1.8.2 Lösungen für die SDS-PAGE***

##### **SDS-Probenpuffer, 5fach (5xLämmli)**

Glyzerin 20%	5mL
1 M Tris-HCl pH6,8	300µL
SDS 20%	2mL
2-Mercaptoethanol	1ml
Bromphenolblau	0,025g
	ad 10ml ddH <sub>2</sub> O

##### **SDS-Laufpuffer, 10fach**

Glyzin	144g
Tris-NH <sub>3</sub>	30g
SDS 20%ige Stammlösung	50mL
	ad 1L ddH <sub>2</sub> O

##### **SDS-PAGE-Trenngel, 15%ig**

Acrylamid 40%	30,0mL
Bisacrylamid 2%	3,4mL



Tris-HCL, 3M Stammlösung pH 8,7	10,0mL
SDS, 20%ige Stammlösung	0,4mL
ddH <sub>2</sub> O	32,0mL

### **SDS-PAGE Trenngel, 10%ig**

Acrylamid 40%	15,0mL
Bisacrylamid 2%	3,4mL
Tris-HCL, 3M Stammlösung pH 8,7	7,5mL
SDS, 20%ige Stammlösung	0,3mL
ddH <sub>2</sub> O	28,5mL

### **SDS-PAGE Sammelgel, 5%ig**

Acrylamid 40%	5,0mL
Bisacrylamid 2%	2,6mL
Tris-HCL, 3M Stammlösung pH 8,7	5,0mL
SDS, 20%ige Stammlösung	0,2mL
ddH <sub>2</sub> O	24,0mL

Alle acrylamidhaltigen Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Zum Starten der radikalischen Polymerisation des Gels wurden für alle beschriebenen Gele kurz vor Ausgießen 10%ige APS-Lösung im Verhältnis 1:200 und TEMED im Verhältnis 1:250 beigemischt.

### **2.1.8.3 Lösungen für das Western Blotting**

#### **Tankpuffer, 10fach**

Glyzin	140g
Tris-NH <sub>3</sub>	30g
SDS	5g
	ad 1L ddH <sub>2</sub> O

### **Wettransfer-Puffer**

Methanol, technischer	200mL
Tankpuffer, 10fach	80mL
	ad 1L ddH <sub>2</sub> O

### **TBS, 10fach, pH 7,6**

Tris-NH <sub>3</sub>	24,2g
NaCl	80,0g
	ad 1L ddH <sub>2</sub> O

Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit konzentrierter Salzsäure.

### **TBS**

TBS, 10fach, pH 7,6	100mL
	ad 1L ddH <sub>2</sub> O

### **TBST**

TBS, 10fach, pH 7,6	100mL
Tween® 20	1mL
	ad 1L TBS

### **Blockierlösung**

Magermilchpulver	5g
	ad 100mL TBST

Die Blockierlösung wurde bei 4°C gelagert.

### ***2.1.8.4 Antikörperlösungen***

#### **BSA-TBST**

BSA	7,5g
Natriumazid	0,5g

Tween® 20	0,5mL ad 0,5L TBS
-----------	----------------------

Die Antikörperlösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

#### ***2.1.8.5 Lösungen für die Zellkultur***

Die Zellen der Linie Hepa1-6 wurden in High Glucose DMEM herangezogen, welchem in der weiter unten beschriebenen Weise Penicillin und Streptomycin sowie fetales Kälberserum zugesetzt wurden. Für die Bereitung der Transfektionsansätze wurde zusatzfreies Medium verwendet.

#### ***2.1.8.6 Lösungen für die histologischen Färbungen***

##### **Zusammensetzung der Alkoholreihe**

Ethanol, 96%ig: 480mL 100%igen Ethanol ad 500mL ddH<sub>2</sub>O

Ethanol, 90%ig: 450mL 100%igen Ethanol ad 500mL ddH<sub>2</sub>O

Ethanol, 80%ig: 400mL 100%igen Ethanol ad 500mL ddH<sub>2</sub>O

Ethanol, 70%ig: 350mL 100%igen Ethanol ad 500mL ddH<sub>2</sub>O

#### ***2.1.8.7 Lösungen für ELISA***

##### **Waschpuffer**

Tween® 20	0,5mL ad 1L PBS
-----------	--------------------

##### **Reagent Diluent**

BSA	5g ad 0,5L PBS
-----	-------------------

Die Lösung wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

### **Substratlösung**

Die im Kit enthaltenen Bestandteile Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin des Substrate Reagent Pack wurden zu gleiche Teilen gemischt.

### **Stopplösung**

Schwefelsäure rauchend	5,7mL
	ad 50ml ddH <sub>2</sub> O

Bei der Herstellung der benötigten Reagenzien wurden die mitgelieferten Angaben befolgt. Dementsprechend wurde der Capture-Antikörper in PBS verdünnt und der Detection-Antikörper, das HRP-Streptavidinkonjugat sowie der Standard im Reagent Diluent verdünnt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Versuchstiere**

Sämtliche Arbeiten erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch den Tierschutzbeauftragten und die Tierethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg. Die Versuchstiere wurden in einem Raum mit halbtägigem Hell/Dunkel-Rhythmus bei 22°C Lufttemperatur und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten und hatten freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

C57BL/6 oder „Black 6“ ist eine speziell gezüchtete Linie der Hausmaus (*Mus musculus*). Knockout-Tiere dieser Linie, bei denen die Gene für SNTA und SNTB2 stillgelegt sind, sowie die dazu passenden Wildtypen wurden von Prof Dr. Marvin E. Adams von der University of Washington in Seattle bereit gestellt. Bei Erreichen eines Alters von 3 Monaten wurden aus jeder Gruppe acht männliche Versuchstiere für 25 Wochen auf eine Hochfettdiät gesetzt. Danach wurden die Tiere anästhesiert und getötet. Zur Serumgewinnung wurde den Tieren Blut abgenommen und in EDTA-Röhrchen für 10 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert um die zellulären Blutbestandteile abzutrennen. Für jedes Tier wurden Stücke des gleichen Leberlappens zum einen bei -80°C eingefroren, zum anderen für die histologische Weiterverarbeitung in Formalin konserviert.

## **2.2.2 Experimente in der Zellkultur**

### **2.2.2.1 Kultur der Zellreihen Hepa1-6 und HepG2**

Es wurde die Zelllinie Hepa1-6 verwendet, welche von murinen Hepatomzellen abstammt. Diese epithelialen Zellen wachsen adhärent und wurden in 75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen gezüchtet, welche in einem Brutschrank bei konstanten 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit aufbewahrt wurden. Als Kulturmedium dienten pro Flasche etwa 10ml High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Mischung (PenStrep) versetzt. Zweimal die Woche wurde das Medium durch frisches ersetzt. Bei Erreichen von über 80% Konfluenz des Zellrasens wurde der Inhalt einer Flasche im Verhältnis 1:5 aufgeteilt. Hierzu wurde der Inhalt der Flasche für fünf Minuten bei 37°C mit 3ml der Protease Trypsin inkubiert, wodurch sich die Verbindungen der Zellen zur Oberfläche lösten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit Medium abgestoppt, was durch die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren ermöglicht wird. Das Medium mit den nun frei schwimmenden Zellen wurde für fünf Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Das alte, den Überstand darstellende Medium wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf die fünf neuen Flaschen zu gleichen Teilen aufgeteilt.

Für die Durchführung der Experimente wurden die Zellen auf die beschriebene Art und Weise vom Flaschenboden gelöst und auf Wellplatten ausgesät.

### **2.2.2.2 RNA-Interferenz und Transfektion**

Um den Effekt des Knockouts im Tiermodell annähernd simulieren zu können, bedient man sich in der Zellkultur des Knockdowns mittels RNA-Interferenz. Sie beruht darauf, dass der Weg der Genexpression vom Gen zum Protein als Zwischenschritt über die mRNA führt. Hierzu wird eine doppelsträngige small interfering RNA (siRNA) entworfen, deren Basenabfolge homolog zu einem kleinen Abschnitt der mRNA des Zielproteins ist und diese in das Innere der Zelle eingebracht. Die folgenden Schritte stellen vermutlich ursprünglich einen Abwehrmechanismus der Zelle gegen fremde Erbinformation, etwa von Viren, dar: eine RNase mit dem Namen Dicer spaltet die doppelsträngige RNA in kleinere, noch etwa 20 Basenpaare lange Fragmente. Diese Stücke aktivieren nun einen Enzymkomplex, den RNA-induced silencing complex (RISC). RISC beginnt nun, sämtliche in der Zelle befindliche mRNA zu degradieren, die zum Leitstrang der eingeschleusten RNA komplementär ist, also auch die des Zielproteins. Dadurch wird der Weg vom Gen zum Protein an dieser Stelle, nach

der Transkription aber noch vor der Translation, unterbrochen, und man spricht vom Knock-down des entsprechenden Gens [71].

Um die siRNA in die Zelle einzuschleusen, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung von Transfektionsreagenzien gewählt: der Endo-Porter des Herstellers GeneTools und XtremeGENE der Firma Roche. Im vorliegenden Experiment wurde versucht, einen kombinierten Knockdown von SNTA und SNTB2 vorzunehmen, zur Kontrolle wurde auch mit jeweils nur einer siRNA transfiziert. Ein einzelner Transfektionsansatz für den Doppelknockdown setzte sich zusammen aus:

siRNA	10µL (je 5µL SNTA-siRNA und SNTB2-siRNA)
Endo-Porter <u>oder</u> Xtreme	5µL
Medium	85µL

In diesem Fall wurde zusatzfreies Medium verwendet. Vor Verwendung wurde der Transfektionsansatz bei Raumtemperatur in einem RNase-freien Cup inkubiert, im Falle des Endo-Porters für eine Stunde, im Falle des Xtreme für 20 Minuten. Auf die Zellen im Well wurde zunächst frisches Medium vorgelegt und der Transfektionsansatz nach Inkubation vorsichtig dazu pipettiert. 48 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen geerntet.

## **2.2.3 Bestimmung von Triglyzeriden und Lipiden**

### **2.2.3.1 Bestimmung von Triglyzeriden**

Die Menge der Triglyzeride im Serum und in den Gewebelysaten wurde enzymatisch-photometrisch mit dem oben genannten Kit von Roche bestimmt. Triglyzeride sind Glycerolmoleküle, die an jeder Hydroxygruppe mit einer Fettsäure verestert sind. Unter Einwirkung der Lipoproteinlipase werden die Triglyzeride in diese Bestandteile hydrolysiert. Das entstandene Glycerol wird von der Glycerolkinase unter ATP-Verbrauch zu Glycerol-3-phosphat umgesetzt. Dieses wird von der Glycerolphosphatoxidase weiter umgesetzt, wobei Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid entstehen. Letzteres reagiert unter Einwirkung einer Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol zu Wasser, Salzsäure und 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenanzon, welches die Flüssigkeit rot färbt [72]. Die Lichtextinktion der entstandenen Lösung kann photometrisch gemessen werden, bevorzugt bei einer Wellenlänge von 550nm. Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten und der Schichtdicke der Lösung kann aus der Extinktion nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die

Konzentration des roten Farbstoffs bestimmt werden. Diese wiederum ist direkt proportional zur Konzentration der ursprünglich vorhandenen Triglyzeride.

Lambert-Beersches Gesetz:  $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ , wobei

- E die Extinktion der Lösung bei einer gegebenen Wellenlänge
- $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient des nachzuweisenden Stoffes bei der gegebenen Wellenlänge
- c die Konzentration des nachzuweisenden Stoffes und
- d die Schichtdicke der Lösung ist.

Durch Umstellung nach c lässt sich bei Kenntnis der anderen Werte und durch Vergleich mit standardisierten Werten hieraus die Konzentration bestimmen.

### ***2.2.3.2 Bestimmung von Cholesterin, Sphingomyelin und Ceramid***

Die Mengen an Cholesterin in den Lebern der Tiere wurden mit dem Cholesterin Einzeltest – Kit von Diaglobal bestimmt.

Serum-Cholesterin, Sphingomyelin und Ceramid wurden in Kooperation im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (Herr PD Dr. G. Liebisch) gemessen [73], [74], [75].

## **2.2.4 Arbeiten mit Proteinen**

### ***2.2.4.1 Extraktion von Proteinen aus Zellen***

48 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen aus den Wells „geerntet“. Hierzu wurde das überstehende Medium aus den Wells abgesaugt und durch eiskaltes PBS mit beigemischem Proteaseinhibitor ersetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen mechanisch vom Wellboden gelöst, wonach sich die meisten frei in der Lösung befanden. Diese wurde fünf Minuten lange bei 4000 rpm in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 120µL eiskaltem RIPA mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Schließlich wurde die enthaltene DNA mittels Ultraschall zerkleinert (jeweils 10 Sekunden bei 20% Intensität) und die erhaltenen Zelllysate bei -20°C eingefroren.

#### ***2.2.4.2 Extraktion von Proteinen aus murinem Gewebe***

Die Leberstückchen der Tiere wurden aus der Aufbewahrung bei -80°C entnommen. Zu ihnen wurden jeweils 2ml RIPA mit Protease- und Phosphataseinhibitoren gegeben, mithilfe des GentleMACS wurden die Organe zerkleinert und so in den RIPA aufgenommen. Die Proben wurden kurz zentrifugiert (10 Sekunden, 600rpm bei 4°C), dann wurden 200µL 10%iges Igepal und 10µL 20%iges SDS zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in Cups überführt und ultraschallbehandelt (drei Durchgänge zu je 10 Sekunden bei 32% Intensität) um die enthaltene DNA zu zerkleinern. Es folgten drei Zentrifugationsschritte (jeweils 10 Minuten, 13.000 rpm, 4°C), wobei nach jedem nur die klare intermediäre Phase überführt und in den nächsten Schritt eingeführt wurde. Anschließend wurden die erhaltenen Leberlysate bei -20°C eingefroren.

#### ***2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen***

Proteinkonzentrationen wurden mit der Bicinchoninsäure-Methode (BCA) nach Smith [76] bestimmt. Hierzu wurden 200µL einer 1:50-Mischung von 4%iger Kupfer-II-sulfatlösung mit Bicinchoninsäure mit 10µL einer verdünnten proteinhaltigen Probe gemischt. Die Verdünnung der Probe erfolgte mit PBS; der Verdünnungsfaktor betrug 1:10 für Zelllysate und 1:100 für die proteinreichen Leberlysate. Die Mischung wurde dann eine halbe Stunde lang bei 37°C inkubiert. Über eine Komplexbildung mit den Peptidbindungen der Proteine werden zwei- zu einwertigen Kupferionen reduziert und verbinden sich in basischem Milieu mit der Bicinchoninsäure zu einem farbigen Komplex. Die Lichtextinktion der entstandenen violetten Lösung kann photometrisch bestimmt werden, bevorzugt bei einer Wellenlänge von 540nm. Die Menge an gebildetem Farbkomplex steht in linearem Zusammenhang mit dem Proteingehalt der Probe; über die gleichzeitige Messung von acht Standard-Proteinlösungen können so über eine Standardkurve die unbekannten Konzentrationen ermittelt werden.

#### ***2.2.4.4 Auftrennung von Proteinen***

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch Aufkochen mit SDS werden die Proteine denaturiert, der Zusatz von 2-Mercaptoethanol reduziert ihre Disulfidbrücken. Da nun die räumliche Struktur der Proteine aufgehoben ist, erfolgt die folgende Trennung rein nach ihrer Masse. Die Auftrennung selbst erfolgt, indem man die Proteine durch ein Polyacrylamidgel laufen lässt, das einem molekularen Maschenwerk gleicht. Je kleiner ein Protein ist, desto höher sei-



ne Laufgeschwindigkeit in dem Gel und desto weiter läuft es demnach in einer gegebenen Zeit [77]. Die Gele sind zweiteilig und bestehen aus einem oberen 5%igen Sammelgel und dem unteren eigentlichen Trenngel, welches je nach Bedarf 15%ig oder 10%ig war. Den Ausgangslösungen wurden vorgegebene Mengen APS und TEMED zugesetzt. Diese Substanzen stoßen die radikalische Kettenpolymerisation an, welche zur Bildung eines Acrylamidnetzes und zur Aushärtung der Gele führt. Daraufhin wurden die Lösungen rasch in einen engen Spalt zwischen zwei Glasplatten gegeben, um dort auszuhärten. In das oben gelegene Sammelgel wurde zudem als Platzhalter ein Kamm gesteckt; durch das Herausziehen nach Aushärten entstanden Taschen. In diese wurden etwa 20µL der Proteinproben pipettiert, nachdem diese mit SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 Minuten in einem auf 95°C vorgeheizten Wärmeblock inkubiert worden waren. Die fertigen Gele mitsamt den Proteinproben wurden in der Elektrophoresekammer des Puffertanks platziert und dieser mit Lauffpuffer gefüllt. Es wurde für 70 Minuten eine Spannung angelegt, sodass ein konstanter Stromfluss von 25mA pro Gel herrschte. Nach Bildung einer einheitlichen „Lauffront“ an der Grenze zwischen Sammel- und Laufgel wanderten die Proteine in dieser Zeit ihrer Masse entsprechend weit durch das Laufgel. Ein in eine der Taschen gegebener Proteinstandard erlaubte die ungefähre Bestimmung der Masse der Proteine.

#### ***2.2.4.5 Western Blot und immunologischer Proteinnachweis***

Nach erfolgreicher Auftrennung im Gel sollen die Proteine auf einer Membran immobilisiert werden, um sie dort mittels antikörper-basierter Verfahren nachweisen zu können [78]. Diese Prozedur wird als Western Blotting bezeichnet. Es wurde ein sogenanntes Wet-Transfer-Verfahren benutzt. Die in diesem Fall genutzte PVDF-Membran, auf welche die Proteine übertragen werden sollen, wurde kurz in Methanol und dann in Transferpuffer eingelegt. Im Transferpuffer wurden auch alle anderen Materialien gelagert: das Polyacrylamid-Gel, die Whatman-Filterpapiere und die Fleece. Das Gel wurde auf die Membran aufgelegt, oben und unten kamen jeweils zwei Filterpapiere und ein Fleece dazu, sodass Gel und Membran von beiden Seiten eingefasst waren. Zur Befestigung wurde das Paket noch in eine Spange eingeklemmt, die dann in die Transferkammer eingelegt wurde. Die Kammer wurde bis zum Rand mit Transferpuffer aufgefüllt und eine Spannung von 80V angelegt, unter deren Einfluss in etwa 90 Minuten die Proteine aus dem Gel auf die Membran wanderten. Das System wurde dabei die ganze Zeit entweder eis- oder durchlaufgekühlt.

Nach erfolgtem Transfer können auf der Membran immunologische Nachweise bestimmter

Proteine erfolgen. Zuvor müssen jedoch unspezifische Bindestellen für Antikörper blockiert werden. Hierzu wurde die Membran für eine Stunde in ein Bad aus proteinhaltiger 5%iger Milchpulverlösung gegeben. Nach drei etwa 15-minütigen Waschvorgängen mit frischem Waschpuffer kann die Membran für 16-18 Stunden bei 4°C mit einer Lösung des primären, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpers inkubiert werden. Die Konzentration des primären Antikörpers in der Lösung variierte je nach nachzuweisendem Protein und Stärke der ausgebildeten Bindung, betrug jedoch meist 1:1000. Danach folgten wieder drei 15-minütige Waschschrte. Im Anschluss wurde mit einer Lösung des sekundären Antikörpers in Milchpulver-Blockierlösung inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und selbst an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. Dieses Enzym kann bestimmte Substrate in optisch aktive Substanzen umsetzen. Die Verdünnung des sekundären Antikörpers betrug 1:5000, die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneuten drei Waschschrten konnte der Nachweis des HRP-Signals erfolgen. Hierzu wurden die Reagenzien des ECL Plus Western Blot Detection Kits nach Vorgabe gemischt und etwa 1ml davon auf die Membran pipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Signal mittels des ECL Hyperfilm oder dem ChemiDoc™ XRS+ Molecular Imager® detektiert. Die Belichtungszeit war hierbei abhängig von der Menge des vorhandenen Proteins sowie der Stärke der Antikörperbindung und betrug zwischen wenigen Sekunden und einer halben Stunde.

#### **2.2.4.6 Coomassie-Färbung**

Die Coomassie-Färbung färbt im Gegensatz zum relativ spezifischen immunologischen Nachweis eher unspezifisch alle Proteine auf der Membran an und ermöglicht so die Abschätzung, ob die Gesamtmenge an Protein in den einzelnen Taschen des Polyacrylamidgels etwa gleich groß war. Die Membran wurde 10 Minuten in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und dann in die Coomassie-Färbeflüssigkeit gegeben, bis eine deutliche Violett-färbung der Proteinbanden erfolgte. Nach abgeschlossener Färbung und einem erneuten Waschschrte wurde die gefärbte Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

#### **2.2.4.7 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Ein ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem Substanzen in wässriger Lösung detektiert werden. Beim hier verwendeten Verfahren handelt es sich genauer um ei-

nen sogenannten Sandwich-ELISA. Dabei ist ein Capture-Antikörper am Boden einer Platte verankert und hält die nachzuweisende Substanz über eine immunologische Bindung fest. Ein zweiter, der Detection-Antikörper, bindet von der „anderen Seite“ an die Substanz, sodass diese wie in einem Sandwich zwischen den beiden Antikörpern liegt. Zum Nachweis ist der zweite Antikörper an ein Enzym gekoppelt, welches ein zugegebenes Substrat in einen farbigen Stoff umwandelt, wobei die dabei entstehende Farbstoffmenge proportional zur Menge der gebundenen, nachzuweisenden Substanz ist. Diese kann photometrisch bestimmt werden und über die Bestimmung von bekannten Standardwerten und die Erstellung einer Standardkurve in die Konzentration der nachzuweisenden Substanz umgerechnet werden.

## **2.2.5 Arbeiten mit RNA und cDNA**

### ***2.2.5.1 Extraktion von RNA aus murinem Gewebe***

Zur Extraktion von RNA aus den Lebern wurde ein trizolhaltiges Reagenz verwendet. Die Lebern wurden wieder im GentleMACS zerkleinert und homogenisiert, dieses Mal aber unter Zugabe von Trizol. Hierbei handelt es sich um eine vorgefertigte Lösung, die auf dem Prinzip der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion beruht [79]. Zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse durch DNA musste in diesen Proben die DNA besonders sorgfältig zerkleinert werden. Dies geschah, indem das Leberhomogenisat mehrfach durch eine kleinkalibrige Kanüle aufgezogen und wieder herausgepresst wurde. Die Isolation der RNA erfolgte anschließend mithilfe des RNeasy Mini Kit unter Befolgung der Herstellerangaben. Die extrahierte RNA wurde in nukleasefreiem Wasser aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

### ***2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA***

Die Lichtextinktion einer RNA-haltigen Lösung kann bestimmt werden, vorzugsweise bei einer Wellenlänge von 260nm. Über das bereits genannte Lambert-Beersche Gesetz kann hieraus die RNA-Konzentration der Lösung berechnet werden. Der Reinheits- bzw. Verunreinigungsgrad der isolierten Nukleinsäuren kann durch den Quotienten der Extinktion bei 260nm durch den der Extinktion bei 280nm abgeschätzt werden. Bei einem Quotienten von 1,8-2,1 wurde von einer akzeptablen Reinheit ausgegangen.

### ***2.2.5.3 Reverse Transkription (RT)***

Um im Folgenden das RNA-Material mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigen zu können, muss es in DNA umgeschrieben werden, sogenannte complementary DNA (cDNA). Enzyme, welche hierzu in der Lage sind heißen RNA-abhängige DNA-Polymerasen oder Reverse Transkriptasen (RT). Aus der Natur sind diese Enzyme unter anderem aus RNA-Viren bekannt, die sie nutzen um ihre Erbinformation in DNA umzuwandeln, die dann vom Wirtsorganismus vervielfältigt wird [80]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein RT-Kit von Promega verwendet, dessen RT-Enzym aus dem Avian Myeloblastosis-Virus (AMV) stammt. Durch den Einsatz von Random Hexamer Primern, die an komplementäre Sequenzen der vorliegenden RNA binden, wird ein Startpunkt für die Aktivität der RT-Enzyme geschaffen.

### ***2.2.5.4 Realtime-Quantitative-PCR mit dem LightCycler***

Mit dieser Methode wird DNA amplifiziert (durch die PCR) und gleichzeitig in Echtzeit die Menge des Amplifikats ausgegeben („Realtime-Quantitative“).

Die PCR beruht auf der Funktion des Enzyms DNA-Polymerase. In der Natur dient dieses Enzym dazu, im Zuge der Replikation den DNA-Satz einer Zelle vor der nächsten Zellteilung zu verdoppeln. Basis hierfür ist die von Watson und Crick aufgedeckte komplementäre Natur des DNA-Doppelstranges [81]. Indem das Enzym zu jedem Einzelstrang die jeweils komplementäre Sequenz erstellt, wird die DNA-Gesamtmenge verdoppelt. Dies bezeichnet man als semikonservative Replikation, da jeder neue DNA-Doppelstrang zur Hälfte aus einem vorher vorhandenen und einem neu synthetisierten Einzelstrang besteht. Als Startpunkt für die Aktion der Polymerasen dienen kurze, zu Sequenzen im Ausgangsstrang komplementäre Oligonukleotide, die sogenannten Primer. Im Labor kann dieses Prinzip verwendet werden, um eine kleine Menge von DNA schnell zu vervielfältigen, entscheidend ist hierbei die Automatisierung des Prozesses und die Verwendung von hitzestabilen Polymerasen aus thermophilen Bakterien wie *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerasen), die durch die für die Strangaufftrennung benötigten hohen Temperaturen keinen Schaden nehmen. Da jeder neu synthetisierte Strang als Ausgangspunkt für die nächste Replikation dienen kann, erfolgt die Amplifikation des Materials exponentiell [82], [83].

Bei der Realtime-Quantitative-PCR kommt als neuer Aspekt die Quantifizierung des Amplifikats hinzu. Diese erfolgt mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes, der in

doppelsträngige DNA interkaliert, wobei der entstehende Komplex Licht emittiert, welches gemessen wird. Die emittierte Lichtmenge korreliert dabei mit der Amplifikatmenge.

Ein Reaktionsansatz für den LightCycler enthielt die Probe mit der zu messenden cDNA, vorgefertigte Reaktionsmischung von Roche (enthält Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate für die Strangbildung, den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I und die Taq-Polymerase), Magnesiumchlorid für die Enzymfunktion, universe und reverse Primer sowie ddH<sub>2</sub>O. Die Sequenz der Primer wurde dabei so gewählt, dass sie den gewünschten cDNA-Abschnitt flankieren. Zur Analyse im LightCycler wurde der Reaktionsansatz in dünne Glaskapillaren pipettiert, die dann auf das Rotationskarussell der Apparatur aufgesetzt wurden. Das Amplifikationsprotokoll lief folgendermaßen ab: In einem ersten Schritt wurden die Proben für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um die Taq-Polymerase zu aktivieren. Dann folgten etwa 40-45 stets gleich ablaufende Zyklen: Jeder Zyklus beinhaltete eine 15sekündige Phase bei 95°C, in der der DNA-Doppelstrang aufgetrennt wurde (Denaturierungsphase), gefolgt von 10 Sekunden, in welchen die Primer an die Einzelstränge banden (Annealingphase). Die Temperatur der Annealingphase war hierbei spezifisch für ein Paar aus Primern und cDNA und betrug etwa 62°C. Die eigentliche Arbeit der Polymerase geschah dann in der Elongationsphase, die bei 72°C 10 Sekunden dauerte.

Nach Ablauf der Zyklen musste überprüft werden, ob das Amplifikat tatsächlich der gewünschten cDNA entsprach oder ob die Primer auch unerwünscht unspezifisch gebunden hatten. Hierzu wurden die Proben noch einmal langsam (0,1°C/s) erwärmt und der Punkt der Fluoreszenzänderung möglichst genau bestimmt. Bei spezifischer Amplifikation sollte hier ein scharfer Übergang bei einer für die cDNA und die Primer typischen Temperatur stattfinden.

Die semiquantitative DNA-Bestimmung erfolgte wie bereits erwähnt über die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR Green I. Diese wurde nach jeder einzelnen Elongationsphase bei einer für Amplifikationsprodukt und Primer spezifischen Temperatur gemessen. Bei einer Betrachtung der Fluoreszenz über sämtliche Zyklen findet sich ein Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz in einem Maße ansteigt, welches nicht als Hintergrundsignal zu werten ist sondern mit der Amplifikation der cDNA zu erklären ist. Dieser sogenannte Crossing Point entsteht während der exponentiellen Phase der Amplifikation. Mittels einer Standardkurve kann nun die Effizienz der durchgeführten PCR in arbiträren Einheiten (au) angegeben werden. Diese Werte werden zum Vergleich der verschiedenen Proben auf die Menge eines sogenannten housekeepers normalisiert. Hierbei handelt es sich um ein Gen, von dem man weiß, dass es keiner Regulation durch die im Experiment veränderten Bedingungen unterliegt (in dieser Arbeit etwa der

Knockout von SNTA und SNTB2). Man gibt also stets einen Quotienten der Menge an untersuchtem Gen mit der Menge eines housekeepers an, da man nur die Effekte betrachten möchte, die durch das Experiment selbst entstanden sind.

## **2.2.6 Histologische Arbeiten**

### ***2.2.6.1 Anfertigen von Gewebeschnitten***

Stücke der Lebern der Tiere wurden nach der Entnahme in 4%iger PBS-gepufferter Formalinlösung konserviert. Um die Präparate histologisch anfärben und unter dem Mikroskop untersuchen zu können, wurden sie in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom in 5µm dünne Scheiben geschnitten. Diese wurden in ein Warmwasserbad gegeben und zur weiteren Verarbeitung auf Objektträger gezogen.

### ***2.2.6.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)***

Bei der HE-Färbung kommen der bläuliche Farbstoff Hämatoxylin und der rote Farbstoff Eosin zur Anwendung. Hämatoxylin färbt saure Strukturen blau, also vor allem den Kern mit enthaltener DNA, die RNA-haltigen Ribosomen und das mit Ribosomen bestückte raue Endoplasmatische Retikulum (rER). Eosin wiederum färbt basische Strukturen rot, also unter anderem das Zytoplasma und Bindegewebsstrukturen [84].

Die Schnitte auf den Objektträgern wurden zunächst in Histol vom Paraffin befreit und dann in einer Alkoholreihe absteigender Konzentration hydratisiert. Nach fünffminütigem Waschen in einem Bad aus destilliertem Wasser erfolgte die eigentliche Färbung, zunächst die Hämatoxylinfärbung. Hierzu wurden die Schnitte für zwei Minuten in ein Hämatoxylinbad gegeben. Anschließend wurde für einige Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült, wodurch der Blauton entstand. Danach erfolgte die Färbung in einer Eosinlösung für fünf Minuten. Um das Wasser wieder aus den Schnitten zu entziehen, wurde die Alkoholreihe in aufsteigender Richtung durchlaufen und noch einmal ein Histolbad angeschlossen. Zuletzt wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt.

### **2.2.6.3 Sirius Red-Färbung**

Diese Färbelösung dient der Sichtbarmachung kollagener Fasern in den Gewebeschnitten. Kollagen erscheint hierbei nach Färbung rot und nicht-kollagenhaltiges Gewebe grün. Das Ausmaß der Kollagenverteilung dient hierbei als Hinweis auf Fibrosierung des Gewebes [85]. In bereits beschriebener Weise wurden die Schnitte erst entparaffiniert und hydratisiert. Das Waschen erfolgte daraufhin zuerst mit 1%iger-Tween-PBS-Lösung und erst danach mit destilliertem Wasser, jeweils für fünf Minuten. Die eigentliche Färbung erfolgte unter dunklen Verhältnissen mit einem Gemisch aus Sirius Red (zur Anfärbung des Kollagens), Fast Green (zur Anfärbung der nicht-kollagenen Areale) und Pikrinsäure für eine halbe Stunde. Nach erneutem fünfminütigen Waschen in destilliertem Wasser schloss sich wieder die für die HE-Färbung bereits beschriebene Dehydratisierung und Eindeckung an.

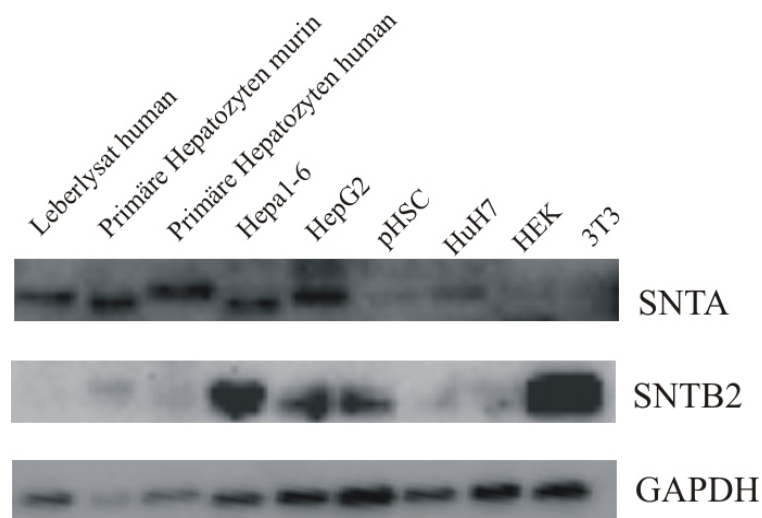
### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms IBM SPSS Statistics 21. Zum Vergleich der Daten der Knockout- mit der der Wildtypgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Gruppen verwendet. Ein erhaltener Unterschied zwischen den Gruppen wurde als signifikant erachtet, falls der p-Wert kleiner als 0,05 war.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression der Syntrophine alpha und beta2 in verschiedenen Zelllinien

Die Syntrophine SNTA und SNTB2 werden in verschiedenen Geweben exprimiert. In Abbildung 4 exemplarisch dargestellt ist die Expression in humanem Leberlysats, in primären Hepatozyten von Maus und Mensch, in humanen primären hepatischen Sternzellen und einigen Zelllinien: Hepa1-6 (murine Hepatomzellen), HepG2 und HuH7 (humane hepatozelluläre Karzinomzellen), HEK (humane embryonale Nierenzellen) sowie 3T3 (murine embryonale Fibroblasten). Es zeigt sich, dass die Expression Gewebe- bzw. zelllinienspezifisch variiert und dass jedes der beiden Syntrophine ein unabhängiges Expressionsmuster aufweist. Die gut detektierbare Expression in den murinen Hepa1-6-Zellen erlaubt deren Verwendung für Zellkulturexperimente im Rahmen dieser Arbeit.



**Abbildung 4:** Western-Blot-Analyse der Syntrophinexpression in verschiedenen Geweben. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

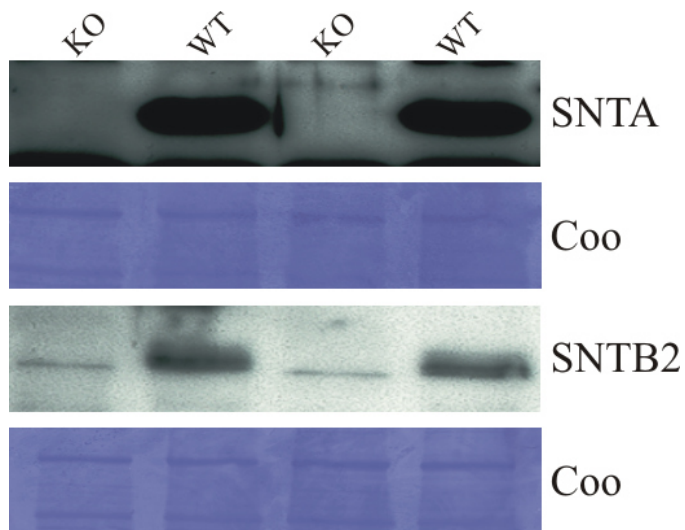
#### 3.2 Knockout der Syntrophine alpha und beta2 im Mausmodell

SNTA- und SNTB2-defiziente Mäuse wurden von Prof. Dr. Marvin E. Adams zur Verfügung gestellt. Im Folgenden wurden diese Tiere vor allem auf die Stoffwechselfunktion der Leber hin untersucht, die folgende Abbildung 5 zeigt daher die gut nachweisbare Expression von



SNTA und SNTB2 in den Lebern der Wildtyp-Tiere sowie den erfolgreich durchgeführten Knockout dieser Gene, der mit einer vollständigen Deletion der entsprechenden Genprodukte

einhergeht, was im Western Blot nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 5:** Western Blot-Analyse der hepatischen Syntrophinexpression. Coomassie-Färbung diente als Beladungskontrolle.

### 3.3 Charakterisierung des Lipidstoffwechsels der Syntrophin-defizienten Mäuse

#### 3.3.1 Gewichtsverlauf

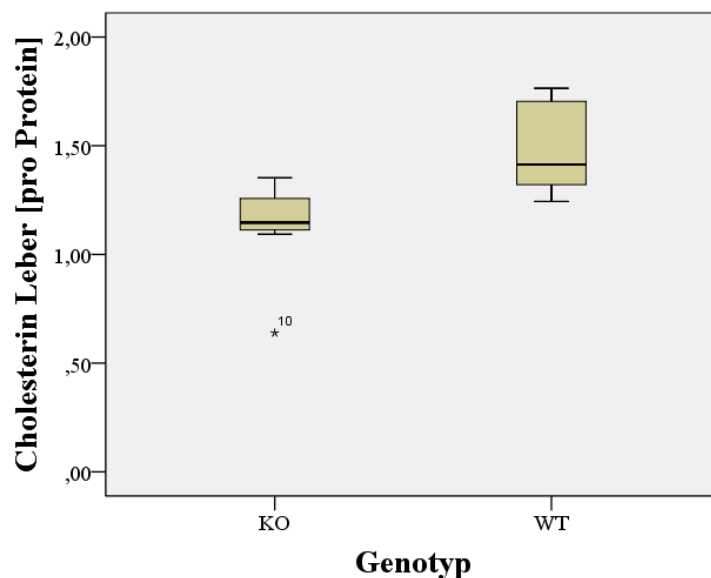
Um Hinweise darauf zu gewinnen, ob das Fehlen der Syntrophine SNTA und SNTB2 einen Einfluss auf den Gesamtmetabolismus der Tiere hat, wurde das Gewicht der Tiere vor und nach Erhalt der Hochfettdiät bestimmt. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der prozentualen Gewichtszunahme über den Zeitraum zwischen den Gruppen (Daten nicht gezeigt).

#### 3.3.2 Bestimmung der Triglyzeridspiegel

Die Triglyzeridspiegel wurden im Lebergewebe sowie im Serum der Tiere bestimmt. Hierbei zeigte sich in beiden Fällen kein signifikanter Unterschied zwischen den Knockout- und den Wildtyp-Tieren (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.3 Bestimmung der Cholesterinspiegel

Die Menge an Gesamtcholesterin wurde im Lebergewebe sowie im Serum der Tiere bestimmt. Während sich im Serum keine signifikanten Unterschiede zeigten, stellte sich heraus, dass in den Lebern der Knockout-Tiere der Cholesteringehalt vermindert war (Abbildung 6 und Daten nicht gezeigt).



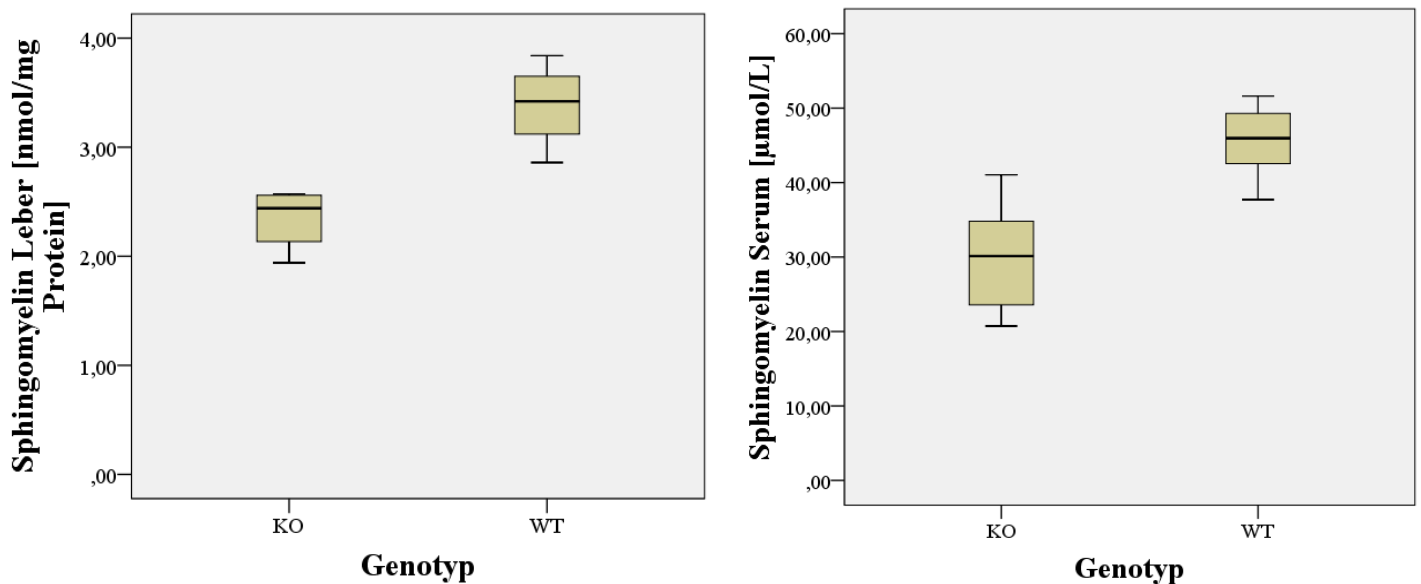
**Abbildung 6:** Cholesterin-Gesamtmenge in der Leber, normalisiert auf Proteingehalt,  $p < 0,01$ .

### 3.3.4 Bestimmung der Ceramidspiegel

Auch in der Gesamtmenge an Ceramid zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen (Daten nicht gezeigt).

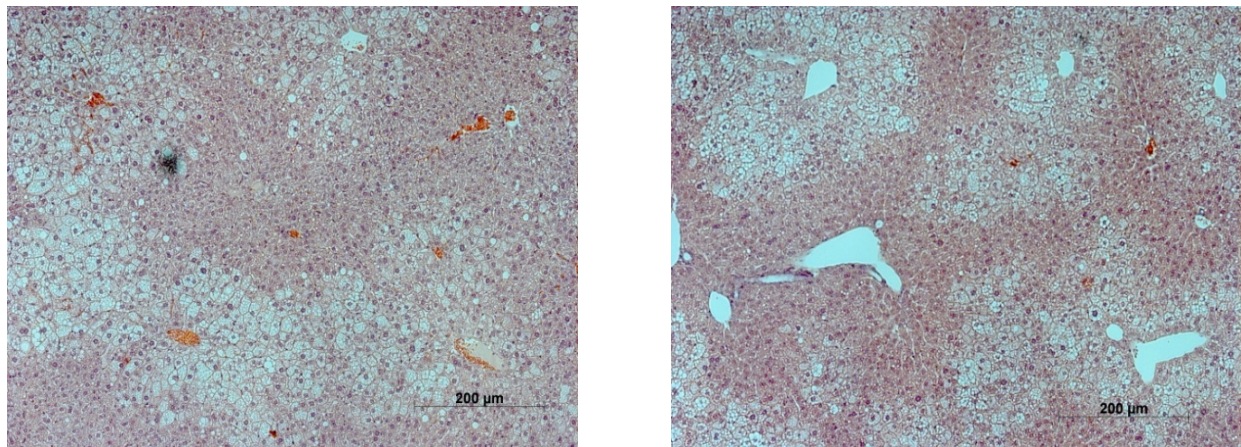
### 3.3.5 Bestimmung der Sphingomyelinspiegel

Die Gesamtmenge an Sphingomyelin war sowohl in den Lebern (normalisiert auf den Proteingehalt) als auch im Serum in den Knockout-Tieren signifikant erniedrigt (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Sphingomyelin-Gesamtmenge in der Leber (links, normalisiert auf Proteingehalt,  $p < 0,05$ ) und im Serum (rechts,  $p < 0,01$ ).

### 3.3.6 Histologische Untersuchung der hepatischen Lipideinlagerung



**Abbildung 8:** HE-Färbung von Leberschnitten von Knockout-(links) und Wildtyp-tieren (rechts). Grad und Muster der Lipideinlagerung unterscheiden sich nicht deutlich erkennbar.

In der HE-Färbung zeigte sich, dass die verwendete Diät zu einer deutlichen hepatischen Lipideinlagerung führt. Hierbei war jedoch kein Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-tieren zu erkennen (Abbildung 8).

### **3.4 Untersuchung der am hepatischen Lipidstoffwechsel beteiligten Proteine**

Da Unterschiede in den Cholesterin- und Sphingomyelinspiegeln aufgefallen waren und auch aus Vorarbeiten Hinweise auf einen veränderten Cholesterinstoffwechsel der Knockouttiere bekannt waren, wurde im Folgenden die Expression einiger am Lipidstoffwechsel beteiligter Proteine untersucht.

#### **3.4.1 ApoA1**

Obwohl die Gesamtcholesterinmenge im Serum nicht verändert war, ist es doch möglich, dass Veränderungen in den Zusammensetzungen der lipidtransportierenden Lipoproteine bestehen. Da wie eingangs geschildert Defekte im ABCA1-Transporter mit niedrigen HDL-Spiegeln einhergehen können und ein Zusammenhang zwischen den Syntrophinen und ABCA1 besteht, wurden die mRNA- und Proteinmengen an ApoAI gemessen, einem in der Leber synthetisierten wichtigen Apolipoprotein in HDL-Partikeln [86]. Es konnte jedoch weder ein signifikanter Unterschied in den hepatischen mRNA-Mengen, welche die Syntheseleistung für ApoAI widerspiegeln, noch in den im Serum befindlichen Proteinmengen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

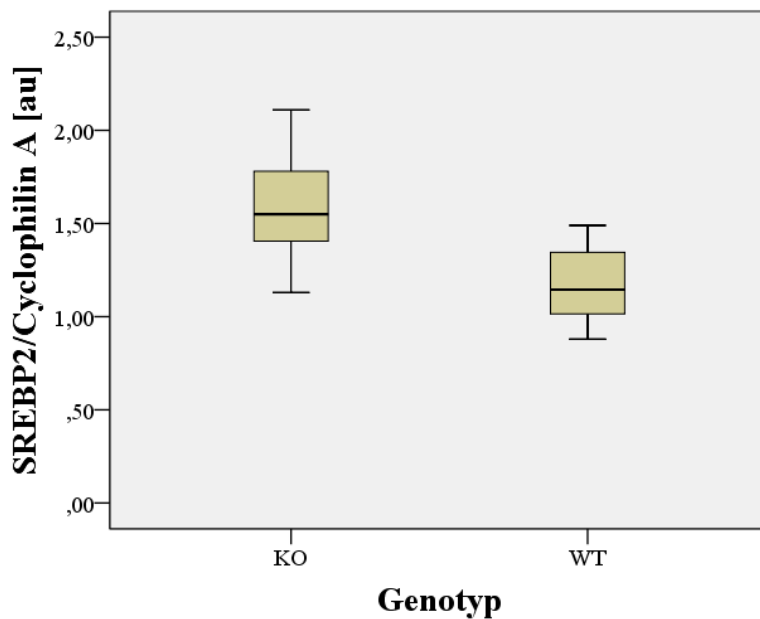
#### **3.4.2 ApoB**

Apolipoprotein B ist ein wichtiger Bestandteil der im Blut zirkulierenden Chylomikronen und LDL-Partikel [50]. Es existieren zwei Formen, ApoB100 und ApoB48, wobei die erste Form in der Leber und die zweite im Darm synthetisiert wird [87]. Die im Serum enthaltene Menge dieses Proteins wurde in einer Vorarbeit mittels eines ELISA analysiert. Die hepatische Syntheseleistung wurde durch Untersuchung der mRNA-Menge untersucht. Auch hier fand sich in beiden Fällen kein signifikanter Unterschied, auf mRNA-Ebene zeigte sich allerdings eine tendenzielle Verminderung in den Knockouttieren ( $p=0.094$ , Daten nicht gezeigt).

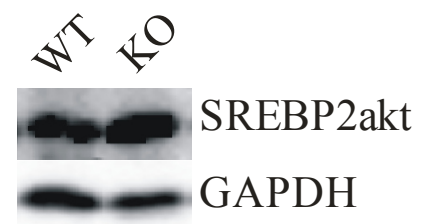
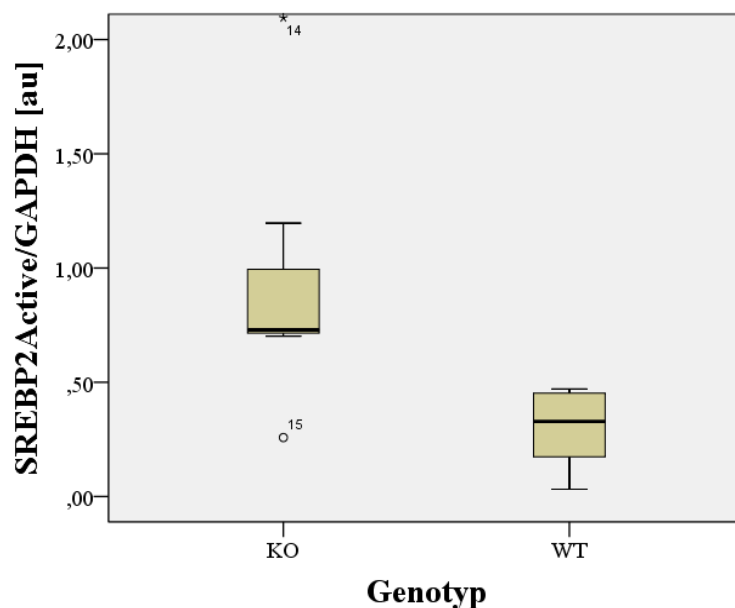
#### **3.4.3 SREBP2**

SREBP2 hat wie bereits beschrieben eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Cholesteringehaltes der Zelle und beeinflusst die Transkription mehrerer für den Lipidstoffwechsel

wichtiger Proteine. Zudem ist eine Beeinflussung, zumindest für SREBP-1, durch das aus Sphingomyelin herstellbare Sphingolipid Ceramid bekannt [88] sowie auch direkt durch den Sphingomyelinspiegel [89]. Es wurden daher in den Lebern der Tiere die mRNA- und Proteinmengen an SREBP2 bestimmt. Auf beiden Ebenen fanden sich erhöhte Spiegel in den Knockout-Tieren (Abbildung 9 und 10).



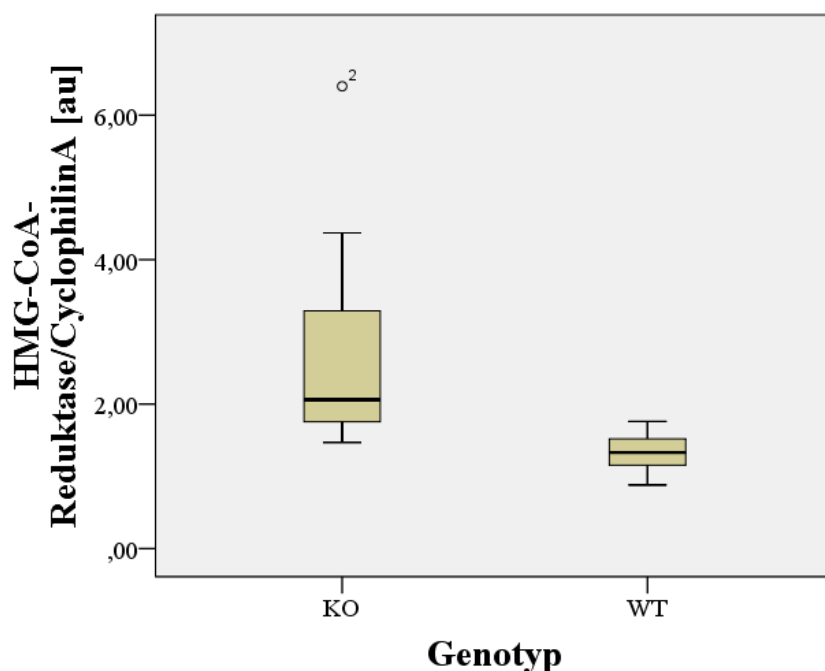
**Abbildung 9:** Analyse der hepatischen mRNA-Menge an SREBP2 mittels Realtime-PCR. Die Normalisierung erfolgte gegen Cyclophilin A.  $p < 0,05$ .



**Abbildung 10:** Western-Blot-Analyse der hepatischen Menge an aktivem SREBP2 (oben), GAPDH diente als Ladungskontrolle. Links die Quantifizierung des Blots,  $p < 0,05$ .

### 3.4.4 HMG-CoA-Reduktase

Die HMG-CoA-Reduktase reduziert HMG-CoA zu Mevalonat. Hierbei handelt es sich um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinbiosynthese, und entsprechend ist die HMG-CoA-Reduktase der Angriffspunkt der medikamentösen Cholesterinsenkung durch Statine [90]. Wegen der Bedeutung dieses Enzyms für die Cholesterinhomöostase wird seine Aktivität streng reguliert. Die HMG-CoA-Reduktase ist eines der Gene, dessen Expression entscheidend durch die Aktivität von SREBP2 bestimmt wird [52]. Es war daher zu erwarten, dass die erhöhte Menge an aktivem SREBP2 eine vermehrte Expression dieses Enzyms zur Folge hat. Des Weiteren gibt es Daten, die nahelegen, dass eine Manipulation der Sphingomyelinspiegel Einfluss auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase hat [91], [92]. Wie erwartet fanden sich erhöhte mRNA-Mengen dieses Enzyms, auf Proteinebene konnte allerdings kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Abbildung 11 und Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 11:** Analyse der hepatischen mRNA-Menge an HMG-CoA-Reduktase mittels Realtime-PCR. Die Normalisierung erfolgte gegen Cyclophilin A.  $p < 0,01$ .

### **3.4.5 LDL-Rezeptor**

Der LDL-Rezeptor dient der Aufnahme von LDL-Partikeln aus dem Blutstrom in die Leber. Dies geschieht (im Gegensatz zum bereits beschriebenen „selektiven“ Transport von Cholesterinestern) über eine rezeptorvermittelte Endozytose des gesamten Lipoproteins, welches dann im Inneren der Zelle in seine Bestandteile aufgelöst wird; der Rezeptor wird recycelt und wandert zurück an seinen Platz in der Plasmamembran [35], [86]. Durch die Aufnahme des cholesterinhaltigen Lipoproteins wird dieses aus dem Blutstrom entfernt und die Leber erhält dadurch „exogenes“ Cholesterin, was ihre eigene Produktion drosselt; Defekte, die die Funktion des LDL-Rezeptor beeinträchtigen, können daher zur familiären Hypercholesterinämie (FH) führen, die mit erhöhten Werten des LDL-Cholesterins einhergeht und schon in jungem Alter zu schweren kardiovaskulären Ereignissen führen kann [93], [35]. Der LDL-Rezeptor ist ebenfalls eines der Proteine, dessen Transkription maßgeblich von SREBP2 beeinflusst wird [52]. Zudem gibt es auch für den LDL-Rezeptor Hinweise, dass seine Funktion durch experimentelle Sphingomyelin-Depletion beeinflusst wird [94]. Auf mRNA-Ebene zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Lebern der beiden Gruppen (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.6 ABCA1**

Die Bedeutung dieses ABC-Transporters für den reversen Cholesterintransport und die Bildung von HDL-Partikeln wurde bereits geschildert. Aufgrund der ebenfalls beschriebenen stabilisierenden Wirkung der Syntrophine auf ABCA1 bestand die Vermutung, dass ein Fehlen von SNTA und SNTB2 die Proteinmenge an ABCA1 verringern könnte. Es existieren auch Daten, welche belegen, dass ABCA1 zur Gruppe der durch SREBP2 regulierten Proteine gehört [95], [96]. Zudem scheint auch im Falle von ABCA1 der Sphingomyelin- und Ceramidgehalt eine Rolle für Lokalisation und Funktionalität zu spielen [97]. Es konnte jedoch weder auf mRNA- noch auf Proteinebene ein signifikanter Unterschied zwischen den hepatischen ABCA1-Mengen der Knockout- und der Wildtypiere gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

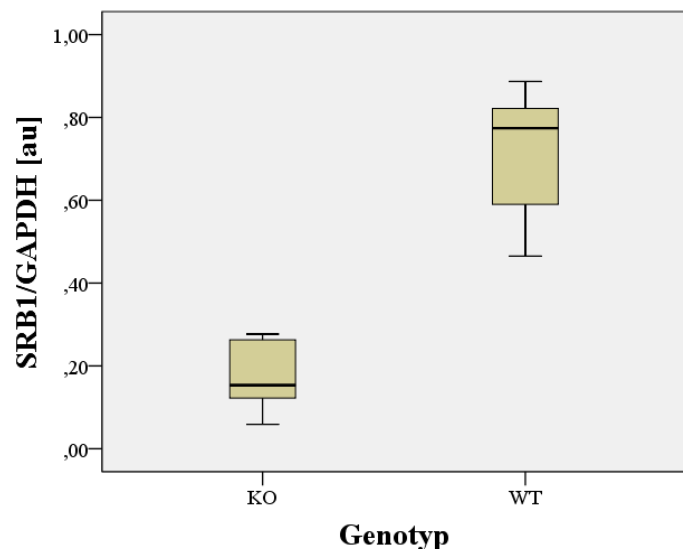
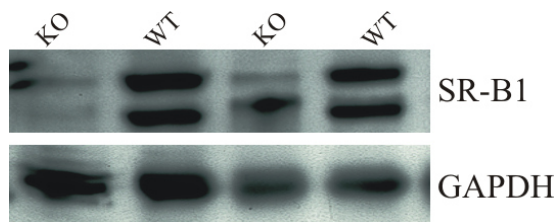
### **3.4.7 SR-BI**

Die Rolle von hepatischem SR-BI beim reversen Cholesterintransport ist bereits beschrieben worden. Es gab mehrere Gründe zu der Annahme, dass dieser Rezeptor in den Knockout-

Tieren einer veränderten Regulation unterliegen würde. Zum einen gehört wohl auch SR-BI zu den Zielgenen von SREBP2 [98]. Zum anderen gibt es für SR-BI einen Zusammenhang mit dem Sphingomyelin- und Cholesteringehalt der Zelle. In einigen Zelllinien hemmt die Zugabe von Sphingomyelin die Aufnahme von Cholesterinestern durch SR-BI [99]. Auch scheint SR-BI bevorzugt in den bereits erwähnten cholesterin- und sphingomyelinreichen lipid rafts der Membran vorzukommen, und die Effektivität seiner Funktion ist abhängig von deren richtiger Zusammensetzung, da sie sich bei experimenteller Manipulation der Sphingomyelin- und Cholesterinmenge ändert [100].

In der Tat fand sich auf Proteinebene eine deutliche und statistisch signifikante Reduktion der hepatischen SR-BI Menge in den Knockout-Tieren (Abbildung 12). Bei Analyse der mRNA-Menge fand sich kein signifikanter Unterschied, was den Verdacht in Richtung einer posttranskriptionellen Beeinflussung dieses Proteins lenkt (Daten nicht gezeigt).

**Abbildung 12:** Western-Blot-Analyse der hepatischen SR-BI-Menge (unten), als Ladungskontrolle diente GAPDH. Rechts die Quantifizierung des Blots,  $p < 0,01$ .



### 3.4.8 Cyp7A1

Cyp7A1 stellt ein zentrales Enzym des Stoffwechselpfades dar, welcher vom Cholesterin zu den Gallensäuren führt und dient somit der "endgültigen Elimination" des Cholesterins aus der Zelle über die Galle in den Darm und damit zum Teil in den Stuhl [101], [59]. Cyp7A1 katalysiert hierbei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, und die Menge an mRNA dieses Enzyms erlaubt einen ersten Überblick über die gesamte Gallensäuresynthese [59]. Da die



Gallensäuresynthese die einzige Möglichkeit ist, Cholesterin aus dem Körper zu entfernen, ist sie ein entscheidender Bestandteil der Cholesterinhomöostase; im Einklang damit scheint es ein enges Wechselspiel zwischen Cyp7A1 und SREBP2 zu geben [102]. Auch zu SR-BI besteht ein Zusammenhang mit der Galleproduktion: In Hepatozyten führt die Überexpression von SR-BI zu einer Zunahme des Cholesteringehaltes in der Galle [103], wobei es sich dabei anscheinend vor allem um das Cholesterin handelt, welches mit Hilfe von SR-BI zuvor aus HDL-Partikeln aufgenommen wurde [104]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Cyp7A1-mRNA-Menge zwischen den beiden Tiergruppen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

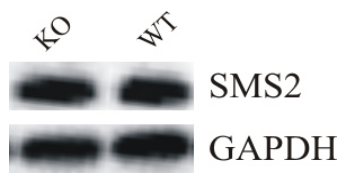
### **3.4.9 Caveolin-1**

Caveolae sind etwa 60 bis 80 nm große Einstülpungen oder „Gruben“ der Plasmamembran, ihre Form wird oft als „flaschenförmig“ beschrieben [105]. Nach einigen Autoren können sie als eine spezialisierte Form der lipid rafts angesehen werden [106]. Ihnen werden zahlreiche Funktionen zugeschrieben, unter anderem im Rahmen der Endozytose, der Transzytose und der Signaltransduktion [105]. Die Caveoline sind Proteine, die wichtiger struktureller Bestandteil der Caveolae sind und unter anderem Signalmoleküle an die Caveolae rekrutieren und ihre Aktivität beeinflussen [107], eine interessante Parallele zu Aufgaben, die den Syntrophinen zugeschrieben werden. In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde Caveolin-1 in Adipozyten als Bindungspartner von SNTB2 identifiziert, daher wurde die Menge dieses Proteins in der vorliegenden Arbeit betrachtet. Zudem ist Caveolin-1 eng mit dem Cholesterinstoffwechsel der Zelle verbunden [108] und kann mit SR-BI interagieren: Caveolin-1-Überexpression kann die Funktion von SR-BI beeinträchtigen, umgekehrt scheint allerdings SR-BI die Proteinmenge an Caveolin-1 durch einen posttranskriptionellen Mechanismus zu erhöhen [109]. Es wurde jedoch keine signifikante Beeinflussung der Caveolin-1-Expression durch den Knockout identifiziert (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.10 SMS2**

Die deutliche Verminderung der hepatischen und der Serumspiegel an Sphingomyelin in den Knockout-Tieren wirft die Frage auf, an welcher Stelle des Sphingolipidmetabolismus diese Differenz entsteht. Die Sphingomyelinsynthasen (SMS) stellen Sphingomyelin aus Ceramid und Phosphatidylcholin her, und erwartungsgemäß führt Überexpression bzw. Knockdown

dieser Enzyme zu Erhöhung bzw. Erniedrigung des zellulären Sphingomyelingehalts [110]. Während SMS1 vor allem um den Zellkern und im Bereich des Golgi-Apparates lokalisiert ist, scheint sich SMS2 eher gehäuft an der Plasmamembran zu finden [111]. Da auch die Syntrophine soweit bisher bekannt ihre Funktionen eher in diesem Bereich ausüben, wurde eine Beeinträchtigung der Isoform SMS2 durch den Knockout für wahrscheinlicher gehalten. Bei der Analyse der hepatischen Proteinmenge konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen gefunden werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Analyse der Proteinmenge an SMS2 mittels Western Blot. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

### 3.5 Untersuchung von Leberschäden infolge der Steatose

Die durchgeführte und oben gezeigte HE-Färbung zeigt eine deutliche Steatose in den Lebern der Tiere aufgrund der Hochfettdiät. Da wie bereits beschrieben eine Steatose zu Fibrose und sogar Zirrhose der Leber voranschreiten kann, sollte untersucht werden, ob sich die Wildtyp- und Knockouttiere bezüglich der Entwicklung eines Leberschadens im Sinne einer NAFLD und ihrer Folgen unterscheiden. Interessanterweise scheint der Knockout von SMS2 die Entwicklung einer NAFLD abzumildern [112] und die mögliche direkte Wirkung von Sphingolipiden wurde bereits eingangs diskutiert. Zudem könnte SREBP2 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielen, da seine Expression im entzündlichen und metabolisch dysfunktionellen Milieu der NAFLD angeregt wird und es selbst wiederum die intrazelluläre Cholesterinmenge erhöht [113]. Da für Sphingomyelin und SREBP2 starke Unterschiede zwischen den Tiergruppen gefunden wurden, erscheint es lohnenswert, sich einen Überblick über mögliche NAFLD/NASH/Fibrose-Marker zu verschaffen, obwohl die HE-Färbung keine starken Unterschiede in der Steatose zeigte.

### 3.5.1 CTGF

Connective Tissue Growth Factor (CTGF) ist ein auch cytosolisch vorkommendes Protein, das aber hauptsächlich zur Erfüllung seiner Funktion in den Extrazellulärraum sezerniert wird, wo es stark profibrotisch wirkt [114]. Dies ist für viele physiologische Funktionen wichtig, unter anderem für die Wundheilung, in der Embryogenese oder für die Differenzierung, Adhäsion und Migration von Zellen, spielt jedoch auch eine zentrale Rolle bei der Entstehung einer Leberfibrose, und in der Tat kann eine Inhibition dieses Proteins die Entstehung einer solchen Fibrose abmildern [114], [115]. In der vorliegenden Arbeit wurde die hepatische Proteinmenge daher als Hinweis auf die Entwicklung einer Fibrose angesehen, es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Knockout- und Wildtyp-tieren gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.2 $\alpha$ -SMA

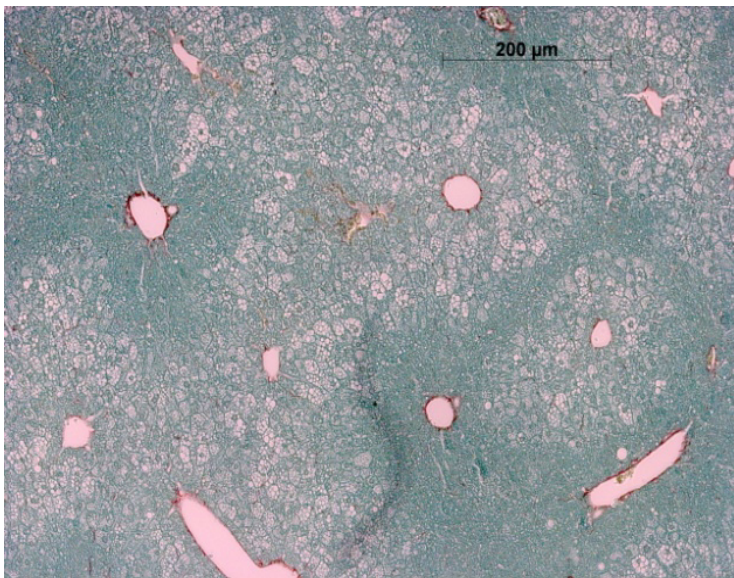
Hepatische Sternzellen (HSC) sind eine kleine Zellpopulation in der Leber; unter physiologischen Bedingungen kommen etwa 3-6 HSCs auf 100 Hepatozyten, doch bei Schäden am Lebergewebe proliferieren sie und differenzieren zu einer myofibroblasten-ähnlichen Zellgruppe, welche entscheidend an der Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) und der Entwicklung einer Leberfibrose beteiligt ist [116], [117].  $\alpha$ -SMA ist ein Marker für diese Zellpopulation und kann als Hinweis für die Aktivierung von HSCs und für Entwicklung und Schweregrad einer Fibrose dienen [116], [118]. Auch für die hepatische Proteinmenge an  $\alpha$ -SMA konnte jedoch kein Mengenunterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-tieren gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.5.3 Histologische Darstellung des Fibrosierungsgrades

Ergebnis der fibrotischen Signal- und Synthesepfade ist letztlich ein massives Ungleichgewicht zwischen Neusynthese und Abbau von Kollagen, welches zur Akkumulation dieses Strukturproteins führt [119]. Mittels der Sirius-Red-Färbung der kollagenen Fasern wurde das Ausmaß der Fibrosierung in den murinen Lebern dargestellt, Kollagen ist hierbei rot gefärbt. Hierbei zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-tieren (Abbildung 13), was mit den Ergebnissen der Proteinmessungen übereinstimmt.



**Abbildung 14:** Anfärbung fibrotischer Areale mittels Sirius-Red-Färbung in Knockout-(oben) und Wildtypieren (unten). Ein deutlicher Unterschied im Fibrosierungsgrad kann nicht identifiziert werden.



### 3.5.4 Bestimmung der Serum-Adiponektinspiegel

Adiponektin wird zu den Adipokinen gerechnet, also aus dem Fettgewebe stammenden Botenstoffen. Es wird vor allem im Fettgewebe synthetisiert und kann im Serum gut nachgewiesen werden [120]. Seine Blutspiegel korrelieren negativ mit beschriebenen Aspekten des metabolischen Syndroms wie Adipositas, BMI und gestörter Glukosetoleranz [121], [122], [123] und dem Vorhandensein einer NAFLD [122], [124]. Ob bzw. zu welchen Anteilen der niedrige Adiponektinspiegel Ursache oder Folge der beschriebenen Stoffwechselprobleme ist, ist noch nicht restlos aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise auf Mechanismen, über welche

Adiponektin protektiv wirkt. Im Falle der NAFLD/NASH scheint es etwa verminderte Wirkung auf die Menge an dem oben beschriebenen CTGF zu haben [125] sowie auf verschiedene andere Weisen protektiv zu wirken; hierzu passend scheint die pharmakologische Anhebung von Adiponektin die NAFLD/NASH zu verbessern [126], [127]. Zudem besteht interessanterweise ein Zusammenhang zwischen Serum-Adiponektinspiegeln und dem Ceramidgehalt von Adipozyten [128], möglicherweise besteht ein ähnlicher Zusammenhang auch für Sphingomyelin. Die im Serum befindliche Menge an Adiponektin wurde mittels eines ELISA gemessen. Auch hierbei fanden sich jedoch keine Unterschiede zwischen den zwei Tiergruppen (Daten nicht gezeigt).

### **3.6 Replizierbarkeit der Ergebnisse in extrahepatischem Gewebe und in der Zellkultur**

Die veränderte Menge an SREBP2 und SR-BI auf Proteinebene in den Syntrophin-defizienten Tieren könnte ein direkter und grundsätzlicher Effekt sein, welcher sich auf die meisten anderen Gewebe übertragen lässt, oder er kommt recht spezifisch im murinem Lebergewebe zustande. Um dies zu überprüfen, wurden die Mengen der in der Leber regulierten Proteine SREBP2 und SR-BI zum einen in einem extrahepatischen Gewebe der Tiere und zum anderen in der Zellkultur gemessen.

#### **3.6.1 Untersuchungen am braunen Fettgewebe**

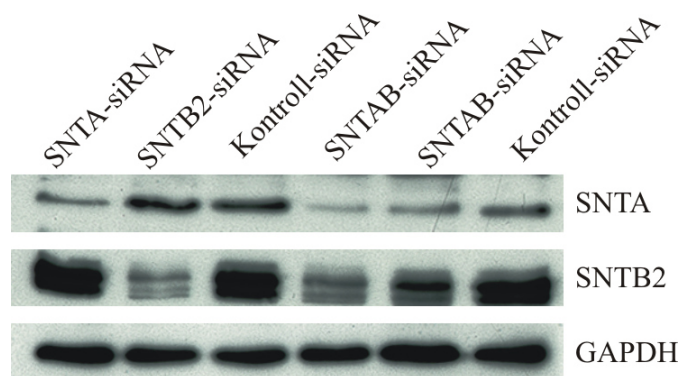
Um zu prüfen, ob der beobachtete Effekt sich in einem extrahepatischen Gewebe der Tiere wiederfindet, wurde das braune Fettgewebe der Tiere untersucht. Obwohl der Knockout erwartungsgemäß auch dort die Syntrophine SNTA und SNTB2 ausgeschaltet hatte, zeigte sich in den Proteinmengen an SREBP2 und SR-BI kein Unterschied zwischen den Wildtyp- und den Syntrophin-defizienten Tieren (Daten nicht gezeigt). Hierdurch wird deutlich, dass der Effekt auf diese beiden Proteine, wenn vielleicht auch nicht rein leberspezifisch, so zumindest nicht ohne weiteres auf jedes Gewebe übertragbar ist.

### 3.6.2 Untersuchungen in der Zellkultur

Die Ergebnisse aus dem braunen Fettgewebe lassen vermuten, dass der Effekt des Syntrophin-Knockouts spezifisch für das Lebergewebe sein könnte. Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, ob der bei den Tieren beobachtete Effekt auf die Proteinmengen von SREBP2 und SR-BI sich in vitro in Zellen hepatischer Herkunft reproduzieren lässt. Hierfür wurde die murine Hepatomlinie Hepa1-6 ausgewählt, da in dieser bereits eine gut detektierbare Expression von Syntrophin SNTA und SNTB2 beobachtet wurde.

#### 3.6.2.1 Knockdown der Syntrophine alpha und beta2

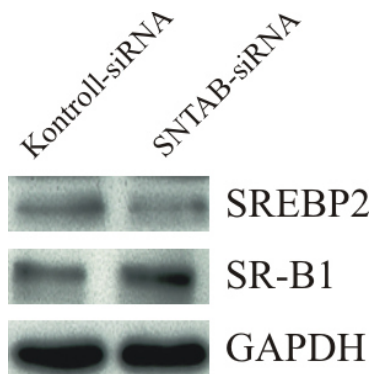
Es wurden siRNAs gegen die Syntrophine alpha und beta2 sowie eine Mischung aus beiden siRNAs in die Zellen eingebracht. Hiermit konnte ein Knockdown der beiden Proteine erzielt werden, in beiden Zelllinien und unabhängig davon, ob Endo-Porter oder X-treme verwendet wurde (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Western-Blot-Analyse der Menge an SNTA und SNTB2 nach Transfektion der Zellen mit siRNA mittels des Endo-Porter. Transfektion mit X-treme zeigte vergleichbare Resultate (nicht gezeigt).

### 3.6.2.2 *SREBP2* und *SR-BI*

In den erfolgreich transfizierten Zellen wurden nun die Proteinmengen an SREBP2 und SR-BI untersucht, der in den murinen Leberlysaten beobachtete Effekt blieb hier jedoch aus (Abbildung 16). Dies lässt vermuten, dass die Herunterregulierung von SR-BI und aktivem SREBP2 nicht rein intrinsisch im Lebergewebe verursacht wird, sondern dass eine komplexe Wechselwirkung der Leber mit anderen Organen vorliegt.



**Abbildung 16:** Western-Blot-Analyse der Menge an SREBP2 und SR-BI in den Kontrollen und den mit Misch-SNTA/B2-siRNA transfizierten Zellen.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Expression der Syntrophine**

Es konnte bestätigt werden, dass jedes der Syntrophine SNTA und SNTB2 ein gewebespezifisches und individuelles Expressionsmuster aufweist. Dies könnte darauf hinweisen, dass die beiden Isoformen auch jeweils individuelle Aufgaben erfüllen, nicht redundant sind und somit eine Isoform einen Ausfall der anderen nicht oder zumindest nicht völlig kompensieren kann. Dazu passt auch, dass in unserer Arbeitsgruppe auch an SNTA- und SNTB2-Einzelknockout-Mäusen geforscht wird und diese Knockouts unterschiedliche Folgen für den Lipidstoffwechsel und die Expression verschiedener Proteine haben. Es wird also auch weiterhin nötig sein, sowohl mit dem Einzel- als auch mit dem Doppelknockout-Modell zu arbeiten um die genauen Bedeutungen der einzelnen Syntrophin-Isoformen zu identifizieren. Kürzlich erschienene Arbeiten legen nahe, dass das Fehlen von SNTA und SNTB2 die Expression von SNTB1 induzieren könnte und dieser Vertreter der Syntrophine den Effekt des Knockouts abmildern könnte [129]. Eine Erhöhung von SNTB1 wurde jedoch in den Lebern der in dieser Arbeit untersuchten SNTA/SNTB2 defizienten Mäuse nicht nachgewiesen. In Zukunft sollte aber auch dieses Protein in die Untersuchungen miteinbezogen werden, da auch ohne kompensatorische Erhöhung eine mögliche kompensatorische Funktion nicht ausgeschlossen werden kann.

Der hier durchgeführte Knockout der Isoformen SNTA und SNTB2 konnte durch Protein-nachweis im Western Blot bestätigt werden.

### **4.2 Einfluss des Knockouts auf den Lipidstoffwechsel**

Es konnte kein Unterschied in der Gewichtszunahme der Tiere über einen Zeitraum von mehreren Monaten auf Hochfettdiät gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass ein Fehlen beider Syntrophin-Isoformen zumindest keinen drastischen Einfluss auf die Energiebilanz des ganzen Organismus hat, wie es etwa von Mutationen im Leptin-Gen bekannt ist, die zu ausgeprägter Adipositas führen [130]. Auch die Gesamtmenge an Triglyzeriden in der Leber und im Serum sowie die durch die Hochfettdiät induzierte hepatische Steatose unterschied sich in den zwei Gruppen nicht signifikant. Für Cholesterin hingegen konnte im Serum keine, in der Leber jedoch eine signifikante Verminderung in den Knockouttieren festgestellt werden.



#### 4.2.1 Unterschiede im Cholesterinstoffwechsel

Es ergaben sich also Hinweise darauf, dass der Cholesterinstoffwechsel durch den Knockout beeinflusst wurde. Mit SREBP2, der HMG-CoA-Reduktase und SR-BI sind drei zentrale Bestandteile des hepatischen Cholesterinmetabolismus entweder auf Protein- oder mRNA-Ebene in den Knockouttieren reguliert.

(Aktives) SREBP2-Protein zeigte sich in den Syntrophin-defizienten Tieren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erhöht. Diese Veränderung lässt sich gut als unmittelbare Reaktion auf die gesunkene hepatischen Cholesterinmenge erklären, da SREBP2 wie bereits beschrieben als „Cholesterinsensor“ fungiert und bei sinkenden Spiegeln dieses Lipids die Transkription von Proteinen antreibt, deren Aktivität die Cholesterinsynthese und Cholesterinaufnahme der Zelle erhöht [51], [52], [53].

Es sind jedoch auch weitere Gründe für die Beeinflussung der SREBP2-Menge denkbar. In manchen Zelllinien bewirkt eine Sphingomyelin-Depletion mittels des Enzyms neutrale Sphingomyelinase (SMase) eine verminderte Proteolyse von SREBP2; somit wandert weniger aktives SREBP2 in den Kern und die Transkription bestimmter SREBP2-beeinflusster Proteine sinkt. Von einigen Autoren wird daher angenommen, dass die Zelle über diesen Mechanismus versucht, die Cholesterin-Sphingomyelin-Ratio konstant zu halten [89]. Nimmt man an, dass in den vorliegenden Knockouttieren das sinkende Sphingomyelin den ersten Effekt des Syntrophin-Knockouts darstellt, so erscheint es möglich, dass als Reaktion darauf die SREBP2-Proteolyse zunächst gehemmt wurde mit dem Effekt sinkender Cholesterinspiegel. Nicht zu dieser Genese passen allerdings die in den Knockouttieren erhöhten Mengen von aktivem SREBP2.

Die HMG-CoA-Reduktase ist das Protein, für welches die Expressionskontrolle durch SREBP2 bisher mit am besten belegt ist, auch in vivo [52], [131]. Die Erhöhung der mRNA dieses Enzyms passt also gut zu den höheren Mengen an aktivem SREBP2, wenn auch auf Proteinebene kein signifikanter Anstieg identifiziert werden konnte. Zudem unterliegt die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wohl teilweise auch einer Regulation durch die Sphingomyelinspiegel der Zelle, und zwar in dem Sinne, dass ihre Aktivität sinkt, wenn Sphingomyelin durch SMase-Behandlung depletiert wird [91], [92]. Es erscheint möglich, dass eine verminderte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase zu einer kompensatorischen Erhöhung ihrer Transkription führen könnte, was die mRNA-Menge erklären würde. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur die Menge des Proteins mittels Western Blot bestimmt, nicht die Enzymaktivität. Diese künftig noch zu messen wäre in diesem Zusammenhang sicherlich sinnvoll.

Die Proteinmenge an SR-BI war in den Knockout-Tieren deutlich reduziert, wobei sich auf mRNA-Ebene keine Veränderung zeigte. Dies ist mit einer Beeinträchtigung der posttranskriptionellen Regulation dieses Gens vereinbar. Auch SR-BI scheint zumindest in manchen Zelllinien zu den von SREBP2 transkriptionell beeinflussbaren Genen zu gehören [98], was mit der in dieser Arbeit gefundenen unveränderten mRNA und gesunkener Proteinmenge allerdings weniger gut vereinbar ist.

Besser zu einer posttranskriptionellen Regulation passen die Befunde, dass SR-BI in HepG2-Zellen vorzugsweise in lipid rafts der Zellmembran lokalisiert ist und dass SMase-Behandlung dieser Zellen die SR-BI-vermittelte Aufnahme von Cholesterinestern beeinträchtigt [99], [100]. Es wäre daher denkbar, dass der Mangel an Sphingomyelin in den Knockout-Tieren zu einer Disruption der Struktur von lipid rafts führt und dadurch die Stabilität von SR-BI beeinträchtigt wird. Möglich erscheint auch eine direkte Bindung der Syntrophine an SR-BI, welche mit dem Knockout wegfällt. Weiterführende Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe schliessen jedoch eine direkte Bindung von SNTA an SR-BI aus [132]. Auch würde man annehmen, dass eine Stabilisierung von SR-BI über eine direkte Bindung an die Syntrophine zu dessen Verminderung in den mit SNTA/B2-siRNA behandelten Zellen führen sollte. Allerdings ließ sich die Interaktion von SR-BI mit dessen Bindepartner PDZK1 auch nicht in vitro bestätigen [133]. Untersuchungen in diese Richtung erscheinen angesichts der starken Verminderung dieses Proteins sinnvoll. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2), welche in der Lebern der Knockout-Tiere erhöht sind, zur Erniedrigung von SR-BI beitragen [132].

Für ABCA1, welches in vitro bereits als Bindepartner von SNTA und SNTB2 identifiziert wurde, konnte keine Verringerung der Proteinmenge im Tiermodell festgestellt werden [26], [28]. Auch eine diskutierte Beeinflussung der Transkription durch das aktive SREBP2 konnte nicht bestätigt werden, da auch die mRNA-Menge an ABCA1 sich zwischen den Tiergruppen nicht signifikant unterschied [95], [96]. Auch für ApoAI, welches zusammen mit den von ABCA1 exportierten Lipiden Bestandteil von HDL-Partikeln ist, konnte weder ein signifikanter Unterschied im Protein-Serumspiegel noch in der hepatischen mRNA als Ausdruck einer regulierten Syntheseleistung gefunden werden. Dies passt zu Untersuchungen in SNTA/B2-defizienten Makrophagen, in denen das Fehlen der Syntrophine nur marginale Auswirkungen auf die Menge an ABCA1-assoziiertem ApoAI hatte [129]. In der genannten Arbeit zeigte sich allerdings eine deutlich erhöhte Turnover-Rate für ABCA1 in diesen Makrophagen ex vivo, was eine Rolle der Syntrophine für die Stabilität dieses Proteins nahelegt [129], auch

wenn dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit im Mausmodell nicht nachvollzogen werden konnte.

Auch die im Blut zirkulierende Menge an ApoB, Bestandteil von Chylomikronen und LDL-Partikeln, wurde mittels ELISA bestimmt und zeigte sich nicht signifikant verändert, für die mRNA in der Leber fand sich eine tendenzielle, aber nicht signifikante Reduktion in den Knockout-Tieren.

Auch für die für den Cholesterinstoffwechsel der Leber hoch bedeutsamen Proteine LDL-R und Cyp7A1 konnte keine Regulation auf mRNA-Ebene durch den Knockout nachgewiesen werden.

Caveolin-1 wurde in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe als Bindungspartner von SNTB2 identifiziert, in vitro-Knockdown von SNTB2 führte zu einer verminderten Proteinmenge an Caveolin-1; umgekehrt führte ein Knockdown von Caveolin-1 zu einer Erhöhung der Menge an SNTB2 [134]. Auch in vivo ist Caveolin-1 im Fettgewebe der SNTB2-defizienten Mäuse auf Proteinebene vermindert [134]. Zudem wirkt auch das Protein SR-BI in vitro stabilisierend auf Caveolin-1 [109]. Trotz dieser bekannten Interaktionen und der Tatsache, dass Caveolae in enger Beziehung zu sphingomyelin- und cholesterinreichen lipid rafts stehen oder sogar als eine Sonderform davon angesehen werden können [135], [107] war Caveolin-1 auf Proteinebene in den Knockout-Tieren nicht signifikant verändert. Es muss allerdings betont werden, dass Entstehung und Verteilung von Caveolae gewebespezifisch sehr unterschiedlich sein können und Befunde aus der Zellkultur oder nichthepatischen Geweben nicht ohne weiteres auf die Leber übertragbar sind [136], [137]. Die eindeutige Identifikation von Caveolin-1 als Bindungspartner von SNTB2 sowie die Assoziation beider Proteine mit Signal- und Rekrutierungsvorgängen an der Plasmamembran sollte allerdings nach wie vor an eine mögliche Beziehung zwischen den beiden denken lassen.

#### **4.2.2 Unterschiede in den Sphingomyelinspiegeln**

In den Knockout-Tieren wurden sowohl in den Leberlysaten als auch im Serum erniedrigte Sphingomyelinspiegel gefunden. SMS2 ist an der Plasmamembran lokalisiert [111], wo auch den Syntrophinen wichtige Funktionen zugeschrieben werden; zudem zeigten SMS2-Knockout-Mäuse erniedrigte Sphingomyelinspiegel in Leber und Serum, was zu den hier identifizierten Phänotypen passen würde [138]. Allerdings zeigten sich dort erhöhte Mengen an Ceramid, die in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnten; auch konnte in den Syntrophin-defizienten Tiere keine verminderte Expression der SMS2 nachgewiesen

werden. Angesichts der starken Hinweise auf eine Beteiligung dieses Enzyms wäre vielleicht die Bestimmung seiner Aktivität sinnvoll. Der Mangel an Sphingomyelin könnte jedoch nicht nur über eine verringerte Neusynthese, sondern auch über einen beschleunigten Abbau zustande kommen. Dies könnte durch eine vermehrte Aktivität von Sphingomyelinasen (SMasen), Enzyme welche das Lipid zu Phosphorylcholin und Ceramid hydrolysieren [139], zustande kommen. Mittlerweile sind mehrere Isoformen bekannt, nämlich die saure, die basische, die sekretorische und die neutrale SMase, welche individuelle Unterschiede in Gewebeverteilung und subzellulärer Lokalisation zeigen; das freigesetzte Ceramid scheint ein Botenstoff zu sein, der an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt ist [47], [140], [141]. Allerdings zeigten sich wie erwähnt weder in der Leber noch im Serum signifikant veränderte Ceramidspiegel. Dennoch sollte auch die Expression bzw. Aktivität der SMasen in diesem Kontext untersucht werden.

Die Plasmamembran stellt eine Hauptquelle für Sphingomyelin dar, und die Menge dieses Lipids kann durch die Aktivität membranständiger Enzyme wie der SMS2 oder der sekretorischen und der neutralen SMase 2 reguliert werden [142]. Da für die Syntrophine eine Interaktion und Stabilisierung mit verschiedenen Membranproteinen nachgewiesen ist, wäre es interessant zu überprüfen ob die genannten Enzyme vielleicht zu den Interaktionspartnern von SNTA und/oder SNTB2 gehören.

Da Sphingomyelin in Lipoproteinen und atherosklerotischen Läsionen nachweisbar ist [44], höhere Serumspiegel ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse sind [45], [46] und SMS2-Defizienz Atherosklerose, Adipositas und Insulinresistenz abmildern kann [143], [112], wäre eine genauere Abklärung des Zusammenhanges zwischen Fehlen der Syntrophine und deutlicher Verringerung dieser Lipidspezies sehr interessant.

### **4.3 Lipid-induzierte hepatische Schäden**

Die HE-Färbung zeigt, dass die Hochfettdiät zu einer Lipideinlagerung in den Lebern der Tiere geführt hat. Allerdings zeigte sich hierbei im histologischen Bild kein Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren. Dennoch wäre es möglich, dass auf molekularer, im Lichtmikroskop nicht sichtbarer Ebene Unterschiede in der Resistenz gegen die Entwicklung einer NAFLD/NASH-ähnlichen Störung bestehen, welche ihre Ursache in der Syntrophin-Defizienz haben. Erwähnt wurde bereits der Verdacht, dass Sphingolipide in diesem Zusam-

menhang lipotoxisch wirken können [69], [70]; zudem sind SMS2-Knockout-Mäuse besser vor hepatischer Lipidakkumulation und den daraus entstehenden Problem geschützt [112]. Vor dem Hintergrund der niedrigeren Sphingomyelinspiegel der Syntrophin-Knockout-Tiere erschien es daher sinnvoll, Parameter der NASH bzw. einer möglichen Fibrose zu untersuchen. Allerdings fanden sich weder veränderte Mengen an CTGF und  $\alpha$ -SMA, zweier für fibrotische Prozesse charakteristischer Proteine, noch eine vermehrte Kollageneinlagerung in der Sirius Red-Färbung. Auch die Serumspiegel des mit der NAFLD assoziierten Adipokins Adiponektin waren nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse schließen eine Regulation der Reaktion auf die Steatose nicht aus, da nur eine kleine Auswahl aller möglichen Parameter für die Beurteilung eines steatotisch-fibrotischen Prozesses untersucht wurde. Dennoch macht das Fehlen signifikanter Unterschiede in allen betrachteten Variablen eine deutliche, pathogenetisch relevante Beeinflussung der NAFLD/NASH-assoziierten Fibrosierung durch SNTA und SNTB2 wenig wahrscheinlich. Syntrophin-defiziente Makrophagen scheinen auf entsprechende Signale mit einer deutlich erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu reagieren [129], sodass es interessant wäre, in Zukunft die Expression dieser Botenstoffe in den Lebern unserer Knockouttiere zu messen.

#### **4.4 Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse**

Die in den Lebern gefundene starke Verminderung von SR-BI und die Erhöhung der aktiven Form von SREBP2 konnten in der vorliegenden Arbeit im braunen Fettgewebe nicht repliziert werden; es fand sich keine signifikante Regulation in den Knockouttieren. Dies lässt vorerst darauf schließen, dass dieser Effekt spezifisch in der Leber zustande kommt. Dennoch sollten noch weitere extrahepatische Gewebe diesbezüglich untersucht werden.

In vitro konnte der Effekt ebenfalls nicht gezeigt werden, obwohl mit Hepa1-6 eine murine, aus der Leber stammende Zelllinie verwendet wurde. Es muss daher vermutet werden, dass der Effekt des Syntrophin-Knockouts kein direkter ist, sondern Mechanismen voraussetzt, die nur in einem mehrzelligen Organismus wie der Maus anzutreffen sind. In der Zellkultur fehlen die Einflüsse sämtlicher endokriner Organe wie der Hypophyse, der Schilddrüse, der Nebenniere, der Geschlechtsorgane oder des Fettgewebes, die großen Einfluss auf den Metabolismus haben können. Auch die Tatsache, dass mehrere in vitro gefundene Einflüsse von SNTA und SNTB2 auf die Mengen verschiedener Proteine nicht repliziert werden konnten,

spricht dafür, dass einige der wichtigen Funktionen der Syntrophine erst in vivo zum Tragen kommen.

Möglicherweise führt auch erst die alimentäre Belastung durch die Hochfettdiät zu den gesehenen Effekten und diese sind unter physiologischen Bedingungen noch nicht identifizierbar. Um dies zu verifizieren, müssten als weitere Kontrollgruppen eigentlich Knockout- und Wildtyp-Tiere auf Normaldiät betrachtet werden. Zudem könnte versucht werden, in der Zellkultur durch eine Fettsäure- bzw. Cholesterinstimulation die Ernährungsweise der Versuchstiere experimentell nachzustellen, um dann vielleicht dort die beobachteten Unterschiede zwischen den Gruppen ausmachen zu können. Angesichts der gewebe- und zellspezifischen Expressionen der Syntrophine wäre auch die Verwendung anderer Zelllinien zum Vergleich sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen die Syntrophin-Isoformen SNTA und SNTB2 fehlen, niedrigere Sphingomyelinspiegel in Serum und Leber aufweisen. Die Ursache hierfür konnte noch nicht identifiziert werden, dazu sind weitere Bestimmungen von Proteinmenge und Aktivität von am Sphingolipidmetabolismus beteiligten Enzymen nötig.

Drei für den Cholesterinstoffwechsel essentielle Proteine zeigten in den Knockouttieren eine Regulation, zum Teil auf Protein-, zum Teil auf mRNA-Ebene, auch war der Gesamtcholesteringehalt der Lebern vermindert. Diese Veränderungen durch das Fehlen von SNTA und SNTB2 wurden hier erstmals identifiziert; es werden weitere Untersuchungen folgen müssen, um aufzuklären, über welchen direkten oder indirekten Mechanismus die Syntrophine mit der Regulation dieser Proteine verbunden sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch darauf schließen, dass es sich um komplexe Wechselwirkungen handelt, welche vor allem in vivo auftreten. Es gibt außerdem Anlass zu der Vermutung, dass posttranskriptionelle Veränderungen im Bereich der Plasmamembran und möglicherweise der lipid rafts eine Rolle hierbei spielen.

Eine Beeinflussung des hepatischen Steatose- und Fibrosegrades konnte trotz der Unterschiede in Cholesterin- und Sphingomyelinspiegeln nicht identifiziert werden.

Zur Funktion der Syntrophine bei der Regulation von Stoffwechselvorgängen ist noch sehr wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit hat einige wichtige Hinweise dazu geliefert, wie SNTA und SNTB2 am hepatischen Lipidmetabolismus beteiligt sein können. Eine Aufklärung der genauen Mechanismen wäre angesichts der Relevanz dieser Stoffwechselvorgänge für volkswirtschaftlich höchst bedeutsame Erkrankungen von großem Interesse.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adams, M.E., et al., *Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25859-65.
2. Alessi, A., et al., *gamma-Syntrophin scaffolding is spatially and functionally distinct from that of the alpha/beta syntrophins*. Exp Cell Res, 2006. **312**(16): p. 3084-95.
3. Adams, M.E., et al., *Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution*. Neuron, 1993. **11**(3): p. 531-40.
4. Piluso, G., et al., *Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15851-60.
5. Ahn, A.H., et al., *The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2724-30.
6. Kramarcy, N.R. and R. Sealock, *Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: developmental time course and differential localization*. Mol Cell Neurosci, 2000. **15**(3): p. 262-74.
7. Ahn, A.H. and L.M. Kunkel, *Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin*. J Cell Biol, 1995. **128**(3): p. 363-71.
8. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 291-329.
9. Iwata, Y., et al., *Syntrophin is an actin-binding protein the cellular localization of which is regulated through cytoskeletal reorganization in skeletal muscle cells*. Eur J Cell Biol, 2004. **83**(10): p. 555-65.
10. Gee, S.H., et al., *Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins*. J Neurosci, 1998. **18**(1): p. 128-37.
11. Connors, N.C., et al., *The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28387-92.
12. Vandebrouck, A., et al., *Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin*. FASEB J, 2007. **21**(2): p. 608-17.
13. Neely, J.D., et al., *Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14108-13.
14. Chen, Z., et al., *Syntrophins regulate alpha1D-adrenergic receptors through a PDZ domain-mediated interaction*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12414-20.
15. Zhou, Y.W., et al., *Laminin-alpha1 globular domains 3 and 4 induce heterotrimeric G protein binding to alpha-syntrophin's PDZ domain and alter intracellular Ca<sup>2+</sup> in muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(2): p. C377-88.
16. Okumura, A., K. Nagai, and N. Okumura, *Interaction of alpha1-syntrophin with multiple isoforms of heterotrimeric G protein alpha subunits*. FEBS J, 2008. **275**(1): p. 22-33.
17. Kobilka, B., *The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling (Nobel Lecture)*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(25): p. 6380-8.
18. Williams, J.C., et al., *The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23341-8.



19. Newbell, B.J., J.T. Anderson, and H.W. Jarrett, *Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binding to mouse alpha1 syntrophin: syntrophin is also a Ca<sup>2+</sup>-binding protein*. Biochemistry, 1997. **36**(6): p. 1295-305.
20. Chockalingam, P.S., S.H. Gee, and H.W. Jarrett, *Pleckstrin homology domain 1 of mouse alpha 1-syntrophin binds phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Biochemistry, 1999. **38**(17): p. 5596-602.
21. Ort, T., et al., *The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(9): p. 621-30.
22. Trajkovski, M., et al., *Nuclear translocation of an ICA512 cytosolic fragment couples granule exocytosis and insulin expression in {beta}-cells*. J Cell Biol, 2004. **167**(6): p. 1063-74.
23. Trajkovski, M., et al., *Regulation of insulin granule turnover in pancreatic beta-cells by cleaved ICA512*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33719-29.
24. Mziaut, H., et al., *ICA512 signaling enhances pancreatic beta-cell proliferation by regulating cyclins D through STATs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 674-9.
25. Schubert, S., et al., *beta2-Syntrophin is a Cdk5 substrate that restrains the motility of insulin secretory granules*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12929.
26. Munehira, Y., et al., *Alpha1-syntrophin modulates turnover of ABCA1*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15091-5.
27. Okuhira, K., et al., *Purification of ATP-binding cassette transporter A1 and associated binding proteins reveals the importance of beta1-syntrophin in cholesterol efflux*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39653-64.
28. Buechler, C., et al., *The carboxyterminus of the ATP-binding cassette transporter A1 interacts with a beta2-syntrophin/utrophin complex*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(2): p. 759-65.
29. Attie, A.D., *ABCA1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis*. Trends in Biochemical Sciences, 2007. **32**(4): p. 172-179.
30. Bodzioch, M., et al., *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. Nat Genet, 1999. **22**(4): p. 347-51.
31. Gordon, D.J., et al., *High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies*. Circulation, 1989. **79**(1): p. 8-15.
32. Rutkowski, J.M., J.H. Stern, and P.E. Scherer, *The cell biology of fat expansion*. J Cell Biol, 2015. **208**(5): p. 501-12.
33. Wymann, M.P. and R. Schreiner, *Lipid signalling in disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(2): p. 162-76.
34. Huwiler, A., et al., *Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1485**(2-3): p. 63-99.
35. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986. **232**(4746): p. 34-47.
36. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
37. Simons, K. and J.L. Sampaio, *Membrane organization and lipid rafts*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a004697.
38. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
39. Lyssand, J.S., et al., *Blood pressure is regulated by an alpha1D-adrenergic receptor/dystrophin signalosome*. J Biol Chem, 2008. **283**(27): p. 18792-800.

40. Lyssand, J.S., et al., *Syntrophin isoforms play specific functional roles in the alpha1D-adrenergic receptor/DAPC signalosome*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **412**(4): p. 596-601.
41. Lange, Y., et al., *Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 3786-93.
42. Molitoris, B.A. and F.R. Simon, *Renal cortical brush-border and basolateral membranes: cholesterol and phospholipid composition and relative turnover*. J Membr Biol, 1985. **83**(3): p. 207-15.
43. Ridgway, N.D., *Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1484**(2-3): p. 129-41.
44. Nilsson, A. and R.D. Duan, *Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin*. J Lipid Res, 2006. **47**(1): p. 154-71.
45. Jiang, X.C., et al., *Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2614-8.
46. Schlitt, A., et al., *Further evaluation of plasma sphingomyelin levels as a risk factor for coronary artery disease*. Nutr Metab (Lond), 2006. **3**: p. 5.
47. Young, S.A., et al., *Sphingolipid and ceramide homeostasis: potential therapeutic targets*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 248135.
48. Barenholz, Y., *Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts"*. Prog Lipid Res, 2002. **41**(1): p. 1-5.
49. Ward, S., et al., *A systematic review and economic evaluation of statins for the prevention of coronary events*. Health Technol Assess, 2007. **11**(14): p. 1-160, iii-iv.
50. Charlton-Menys, V. and P.N. Durrington, *Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules*. Exp Physiol, 2008. **93**(1): p. 27-42.
51. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. Cell, 1997. **89**(3): p. 331-40.
52. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
53. Goldstein, J.L., R.B. Rawson, and M.S. Brown, *Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis*. Arch Biochem Biophys, 2002. **397**(2): p. 139-48.
54. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
55. Landschulz, K.T., et al., *Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat*. J Clin Invest, 1996. **98**(4): p. 984-95.
56. Annema, W. and U.J. Tietge, *Regulation of reverse cholesterol transport - a comprehensive appraisal of available animal studies*. Nutr Metab (Lond), 2012. **9**(1): p. 25.
57. Hegele, R.A., *Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(2): p. 109-21.
58. Schaefer, E.J., *Lipoproteins, nutrition, and heart disease*. Am J Clin Nutr, 2002. **75**(2): p. 191-212.
59. Chiang, J.Y., *Bile acids: regulation of synthesis*. J Lipid Res, 2009. **50**(10): p. 1955-66.
60. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.

61. Charlton, N., et al., *Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology, 2002. **35**(4): p. 898-904.
62. Angulo, P., *Nonalcoholic fatty liver disease*. N Engl J Med, 2002. **346**(16): p. 1221-31.
63. Adams, L.A., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 113-21.
64. Bedogni, G., et al., *Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study*. Hepatology, 2005. **42**(1): p. 44-52.
65. Bellentani, S., et al., *Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 155-61.
66. Machado, M., P. Marques-Vidal, and H. Cortez-Pinto, *Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery*. J Hepatol, 2006. **45**(4): p. 600-6.
67. Van Rooyen, D.M., et al., *Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(4): p. 1393-403, 1403 e1-5.
68. Van Rooyen, D.M., et al., *Pharmacological cholesterol lowering reverses fibrotic NASH in obese, diabetic mice with metabolic syndrome*. J Hepatol, 2013. **59**(1): p. 144-52.
69. Pagadala, M., et al., *Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease*. Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 365-71.
70. Alkhouri, N., L.J. Dixon, and A.E. Feldstein, *Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **3**(4): p. 445-51.
71. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
72. Klotzsch, S.G. and J.R. McNamara, *Triglyceride measurements: a review of methods and interferences*. Clin Chem, 1990. **36**(9): p. 1605-13.
73. Liebisch, G., et al., *Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. J Lipid Res, 1999. **40**(8): p. 1539-46.
74. Liebisch, G., et al., *High-throughput quantification of phosphatidylcholine and sphingomyelin by electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled with isotope correction algorithm*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1686**(1-2): p. 108-17.
75. Liebisch, G., et al., *High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(1): p. 121-8.
76. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
77. Weber, K. and M. Osborn, *The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. J Biol Chem, 1969. **244**(16): p. 4406-12.
78. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
79. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
80. Harbers, M., *The current status of cDNA cloning*. Genomics, 2008. **91**(3): p. 232-42.
81. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
82. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.

83. Brock, T.D., *The value of basic research: discovery of Thermus aquaticus and other extreme thermophiles*. Genetics, 1997. **146**(4): p. 1207-10.
84. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
85. Huang, Y., et al., *Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome*. Liver Int, 2013. **33**(8): p. 1249-56.
86. Wasan, K.M., et al., *Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(1): p. 84-99.
87. Wang, A.B., D.P. Liu, and C.C. Liang, *Regulation of human apolipoprotein B gene expression at multiple levels*. Exp Cell Res, 2003. **290**(1): p. 1-12.
88. Worgall, T.S., et al., *Ceramide synthesis correlates with the posttranscriptional regulation of the sterol-regulatory element-binding protein*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(5): p. 943-8.
89. Scheek, S., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(21): p. 11179-83.
90. Tobert, J.A., *Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(7): p. 517-26.
91. Gupta, A.K. and H. Rudney, *Plasma membrane sphingomyelin and the regulation of HMG-CoA reductase activity and cholesterol biosynthesis in cell cultures*. J Lipid Res, 1991. **32**(1): p. 125-36.
92. Subbaiah, P.V., J.M. Sowa, and D.K. Singh, *Sphingolipids and cellular cholesterol homeostasis. Effect of ceramide on cholesterol trafficking and HMG CoA reductase activity*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2008. **474**(1): p. 32-38.
93. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Familial hypercholesterolemia: defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(3): p. 788-92.
94. Xu, X.X. and I. Tabas, *Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24849-58.
95. Tamahiro, N., et al., *Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 21090-9.
96. Wong, J., C.M. Quinn, and A.J. Brown, *SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR*. Biochem J, 2006. **400**(3): p. 485-91.
97. Witting, S.R., J.N. Maiorano, and W.S. Davidson, *Ceramide enhances cholesterol efflux to apolipoprotein A-I by increasing the cell surface presence of ATP-binding cassette transporter A1*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40121-7.
98. Treguier, M., et al., *Transcription factor sterol regulatory element binding protein 2 regulates scavenger receptor Cla-1 gene expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2358-64.
99. Subbaiah, P.V., L.R. Gesquiere, and K. Wang, *Regulation of the selective uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins by sphingomyelin*. J Lipid Res, 2005. **46**(12): p. 2699-705.
100. Rhainds, D., et al., *Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 15): p. 3095-105.

101. Pandak, W.M., et al., *Effects of CYP7A1 overexpression on cholesterol and bile acid homeostasis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(4): p. G878-89.
102. Li, T., et al., *Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice*. Hepatology, 2013.
103. Kozarsky, K.F., et al., *Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 414-417.
104. Ji, Y., et al., *Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile*. J Biol Chem, 1999. **274**(47): p. 33398-402.
105. Parton, R.G. and K. Simons, *The multiple faces of caveolae*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(3): p. 185-94.
106. Kurzchalia, T.V. and R.G. Parton, *Membrane microdomains and caveolae*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(4): p. 424-31.
107. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1341-79.
108. Hailstones, D., et al., *Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells*. J Lipid Res, 1998. **39**(2): p. 369-79.
109. Frank, P.G., et al., *Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I*. Biochemistry, 2002. **41**(39): p. 11931-40.
110. Ding, T., et al., *SMS overexpression and knockdown: impact on cellular sphingomyelin and diacylglycerol metabolism, and cell apoptosis*. J Lipid Res, 2008. **49**(2): p. 376-85.
111. Huitema, K., et al., *Identification of a family of animal sphingomyelin synthases*. EMBO J, 2004. **23**(1): p. 33-44.
112. Mitsutake, S., et al., *Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes*. J Biol Chem, 2011. **286**(32): p. 28544-55.
113. Van Rooyen, D.M. and G.C. Farrell, *SREBP-2: a link between insulin resistance, hepatic cholesterol, and inflammation in NASH*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(5): p. 789-92.
114. Gressner, O.A. and A.M. Gressner, *Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases*. Liver Int, 2008. **28**(8): p. 1065-79.
115. Hao, C., et al., *Inhibition of connective tissue growth factor suppresses hepatic stellate cell activation in vitro and prevents liver fibrosis in vivo*. Clin Exp Med, 2013.
116. Moreira, R.K., *Hepatic stellate cells and liver fibrosis*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(11): p. 1728-34.
117. Cassiman, D., et al., *Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers*. J Hepatol, 2002. **36**(2): p. 200-9.
118. Akpolat, N., et al., *The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study*. Histopathology, 2005. **47**(3): p. 276-80.
119. Chen, C.Z. and M. Raghunath, *Focus on collagen: in vitro systems to study fibrogenesis and antifibrosis state of the art*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2009. **2**: p. 7.
120. Scherer, P.E., et al., *A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 26746-9.
121. Arita, Y., et al., *Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 79-83.
122. Zou, C.C., et al., *Serum adiponectin, resistin levels and non-alcoholic fatty liver disease in obese children*. Endocr J, 2005. **52**(5): p. 519-24.

123. Weyer, C., et al., *Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 1930-5.
124. Pagano, C., et al., *Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease*. European Journal of Endocrinology, 2005. **152**(1): p. 113-118.
125. Walter, R., et al., *Adiponectin reduces connective tissue growth factor in human hepatocytes which is already induced in non-fibrotic non-alcoholic steatohepatitis*. Exp Mol Pathol, 2011. **91**(3): p. 740-4.
126. Gastaldelli, A., et al., *Pioglitazone in the treatment of NASH: the role of adiponectin*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(6): p. 769-75.
127. Buechler, C., J. Wanninger, and M. Neumeier, *Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(23): p. 2801-11.
128. Blachnio-Zabielska, A.U., et al., *Sphingolipid content of human adipose tissue: relationship to adiponectin and insulin resistance*. Obesity (Silver Spring), 2012. **20**(12): p. 2341-7.
129. Tamehiro, N., et al., *LXR Agonism Upregulates the Macrophage ABCA1/Syntrophin Protein Complex That Can Bind ApoA-I and Stabilized ABCA1 Protein, but Complex Loss Does Not Inhibit Lipid Efflux*. Biochemistry, 2015. **54**(46): p. 6931-41.
130. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
131. Horton, J.D., et al., *Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2331-9.
132. Hebel, T., et al., *Lipid abnormalities in alpha/beta2-syntrophin null mice are independent from ABCA1*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1851**(5): p. 527-36.
133. Tsukamoto, K., et al., *Challenges in using cultured primary rodent hepatocytes or cell lines to study hepatic HDL receptor SR-BI regulation by its cytoplasmic adaptor PDZK1*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69725.
134. Bauer, S., *Untersuchungen zur Rolle von beta2-Syntrophin in Adipozyten*. 2012.
135. Hill, W.G., et al., *Water and solute permeability of rat lung caveolae: high permeabilities explained by acyl chain unsaturation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(1): p. C33-41.
136. Li, W.P., et al., *Cell-specific targeting of caveolin-1 to caveolae, secretory vesicles, cytoplasm or mitochondria*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 7): p. 1397-408.
137. Hansen, C.G., et al., *Deletion of cavin genes reveals tissue-specific mechanisms for morphogenesis of endothelial caveolae*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1831.
138. Liu, J., et al., *Sphingomyelin synthase 2 is one of the determinants for plasma and liver sphingomyelin levels in mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(6): p. 850-6.
139. Kanfer, J.N., et al., *The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue*. J Biol Chem, 1966. **241**(5): p. 1081-4.
140. Pavoine, C. and F. Pecker, *Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 175-83.
141. Bartke, N. and Y.A. Hannun, *Bioactive sphingolipids: metabolism and function*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S91-6.
142. Milhas, D., C.J. Clarke, and Y.A. Hannun, *Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: Implications for bioactive sphingolipids*. Febs Letters, 2010. **584**(9): p. 1887-1894.
143. Liu, J., et al., *Macrophage sphingomyelin synthase 2 deficiency decreases atherosclerosis in mice*. Circ Res, 2009. **105**(3): p. 295-303.

## Eigene Publikationen

### *Lipid abnormalities in alpha/beta2-syntrophin null mice are independent from ABCA1.*

**Hebel T**, Eisinger K, Neumeier M, Rein-Fischboeck L, Pohl R, Meier EM, Boettcher A, Froehner SC, Adams ME, Liebisch G, Krautbauer S, Buechler C. Biochim Biophys Acta. 2015 May;1851(5):527-36. doi: 10.1016/j.bbailip.2015.01.012. Epub 2015 Jan 24.

### *Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes.*

Eisinger K, Krautbauer S, **Hebel T**, Schmitz G, Aslanidis C, Liebisch G, Buechler C. Exp Mol Pathol. 2014 Aug;97(1):37-43. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.05.002. Epub 2014 May 14.

## **7 Danksagung**

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Böhler bedanken, die mir die Anfertigung dieser Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat und die in jedem Abschnitt der Durchführung ein offenes Ohr für alle Fragen und Anliegen hatte.

Bei Herrn Prof. Dr. Aslanidis bedanke ich mich für die Idee, eine Dissertation in dieser Arbeitsgruppe durchzuführen sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großer Dank gilt auch allen Teammitgliedern: Kristina Eisinger, Sabrina Krautbauer, Yvonne Hader und Tanja Späth, die stets geduldig die vielen Fragen eines Mediziners zur praktischen Laborarbeit beantworteten und für eine ausgesprochen nette und kollegiale Atmosphäre sorgten.

Herrn Prof. Dr. Schölmerich und seiner Nachfolgerin Frau Prof. Dr. Müller-Schilling, welche während der Dauer dieser Arbeit die Leitung der Klinik für Innere Medizin I innehatten, danke ich für die Möglichkeit, in ihrer Abteilung diese Dissertation anzufertigen.